

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001085

International filing date: 03 February 2005 (03.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP

Number: PCT/EP2004/001034

Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 April 2005 (04.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Europäisches
Patentamt

European Patent
Office

PCT/EP2005/001085

Office européen
des brevets

EP05/1085



Bescheinigung

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

Certificate

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Attestation

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

01.04.2005

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p. o.

S. Spreafico

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 04/001034

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.: PCT/EP 04/001034
Application no.:
Demande n°:

Anmelder: 1. Evotec Technologies GmbH - Düsseldorf, Deutschland
Applicant(s): 2. MÜLLER, Torsten - Berlin, Deutschland (nur US)
Demandeur(s): 3. HUMMEL, Stefan - Haseldorf, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Untersuchungsverfahren für biologische Zellen und zugehörige
Untersuchungseinrichtung

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 04. Februar 2004 (04.02.2004)

In Anspruch genommene Priorität(en)
Priority(ies) claimed
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Tag: 05. Februar 2003
State: Date: (05.02.2003)
Pays: DEUTSCHLAND

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt: 103 04 653.4

Bemerkungen: Weitere Anmelder:
Remarks:
Remarques:

4. PFENNING, Annette - Berlin, Deutschland (nur US)
5. GRADL, Gabriele - Berlin, Deutschland (nur US)
6. BONSEN, Axel - Hamburg, Deutschland (nur US)
7. SCHNELLE, Thomas - Berlin, Deutschland (nur US)
8. MEYER, Rüdiger - Hamburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsanspruch:

DEUTSCHLAND

09. Mai 2003
(09.05.2003)

103 20 956.5

16059/PCT

Untersuchungsverfahren für biologische Zellen und zugehörige
Untersuchungseinrichtung

5

Die Erfindung betrifft ein Untersuchungsverfahren für vorzugsweise biologische Partikel, insbesondere zur Untersuchung biologischer Zellen in einem Zellsortierer, gemäß Anspruch 1 sowie eine entsprechende Untersuchungseinrichtung gemäß Anspruch 14.

10

Aus Müller, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles", Biosensors and Bioelectronics 14 (1999) 247-256 ist ein Untersuchungsverfahren für biologische Zellen bekannt, bei dem die zu untersuchenden Zellen in einem Trägerstrom eines mikrofluidischen Systems suspendiert sind und dielektrophoretisch manipuliert und sortiert werden. In dem Trägerstrom werden die zu untersuchenden Zellen zunächst durch eine trichterförmige dielektrrophoretische Elektrodenanordnung (engl. "Funnel") aufgereiht und anschließend in einem dielektrrophoretischen Käfig (engl. "Cage") festgehalten, um die in dem Käfig befindlichen Zellen im ruhenden Zustand untersuchen zu können, wozu mikroskopische, spektroskopische oder fluoreszenzoptische Messmethoden angewendet werden können. In Abhängigkeit von der Untersuchung der in dem dielektrrophoretischen Käfig gefangenen Zellen können diese anschließend sortiert werden, wozu der Bediener eine Sortiereinrichtung ansteuert, die aus einer in dem Trägerstrom stromabwärts hinter dem dielektrrophoretischen Käfig angeordneten dielektrrophoretischen Elektrodenanordnung besteht.

Nachteilig an dem vorstehend beschriebenen bekannten Untersuchungsverfahren ist, dass die zu untersuchenden Zellen in ei-

ner Probe oft sehr unterschiedlich sind. Bei sehr heterogenen Proben, aus denen z.B. gewisse Zielzellen durch ein Verfahren identifiziert und diese Zielzellen dann isoliert werden sollen, machen die Zielzellen oftmals nur einen geringen Anteil 5 an der gesamten Probe aus. Die anderen Zellen tragen nicht die gewünschten Eigenschaften oder sind nicht mehr vital, also bereits tot. Zudem kommt es oft vor, dass die Zellen nicht vollständig vereinzelt sind, sondern dass manche Zellen das System als Aggregat von zwei oder mehr Zellen passieren. Dies 10 ist ein unerwünschtes Ergebnis. Die detaillierte Untersuchung einzelner Zellen oder Aggregate in einem Feldkäfig ist aber ein zeitaufwändiger Prozess, so dass die Untersuchung der gesamten Zellprobe im Feldkäfig sehr lange dauern würde.

15 Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, das vorstehend beschriebene bekannte Untersuchungsverfahren dahingehend zu verbessern, dass eine Untersuchung von nicht interessierenden biologischen Zellen (z.B. toten Zellen) oder Zellkluppen in dem dielektrophoretischen Käfig vermieden werden kann.

20 Die Aufgabe wird, ausgehend von dem eingangs beschriebenen bekannten Untersuchungsverfahren, durch die Merkmale des Anspruchs 1 bzw. – hinsichtlich einer entsprechenden Untersuchungseinrichtung – durch die Merkmale des Anspruchs 14 ge- 25 löst.

Die Erfindung umfasst die allgemeine technische Lehre, vor der Untersuchung der in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in dem dielektrophoretischen Käfig zunächst eine Voruntersuchung der sich mit dem Trägerstrom bewegenden Partikel durchzuführen, um die für eine weitere Untersuchung interessanten Partikel anschließend in dem dielektrophoretischen Käfig fangen und untersuchen zu können.

Die Voruntersuchung kann beispielsweise die Intensität einer Fluoreszenz, die Vitalität einer Zelle und/oder die Frage betreffen, ob es sich um eine einzelne Zelle oder ein Aggregat handelt. Weiterhin kann bei der Voruntersuchung ermittelt werden, ob es sich um Zellen oder Material handelt, das in Form und Größe nicht Primärziel der näheren Untersuchung ist, z.B. Verunreinigungen oder andere Zellen, sofern sie sich von den Zielzellen unterscheiden.

Bei dem erfindungsgemäßen Untersuchungsverfahren erfolgt also zunächst eine Voruntersuchung der in dem Trägerstrom suspendierten Partikel und eine Selektion bestimmter Partikel in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Voruntersuchung, während die eigentliche Hauptuntersuchung nur für die zuvor selektierten Partikel durchgeführt wird, die hierzu abgebremst werden, um eine aussagefähige Hauptuntersuchung zu ermöglichen, die durch eine Bewegung der Partikel erschwert würde.

Es ist im Rahmen der Erfindung nicht zwingend erforderlich, dass die in Abhängigkeit von der Voruntersuchung selektierten Partikel vor der Hauptuntersuchung vollständig zum Stillstand gebracht werden, indem diese beispielsweise in einem dielektrophoretischen Käfig gefangen werden. Es ist im Rahmen der Erfindung vielmehr auch möglich, dass die in Abhängigkeit von der Voruntersuchung selektierten Partikel in dem Trägerstrom lediglich soweit abgebremst werden, dass eine aussagekräftige Untersuchung der Partikel möglich ist.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass der im Rahmen der Erfindung verwendete Begriff eines Partikels allgemein zu verstehen ist und nicht auf einzelne biologische Zellen beschränkt ist. Vielmehr umfasst dieser Begriff auch synthetische oder biologische Partikel, wobei sich besondere Vorteile ergeben, wenn die Partikel biologische Materialien, also beispielsweise

biologische Zellen, Zellgruppen, Zellbestandteile oder biologisch relevante Makromoleküle, jeweils ggf. im Verbund mit anderen biologischen Partikeln oder synthetischen Trägerpartikeln umfassen. Synthetische Partikel können feste Partikel, 5 flüssige, vom Suspensionsmedium abgegrenzte Teilchen oder Mehrphasenpartikel umfassen, die gegenüber dem Suspensionsmedium in dem Trägerstrom eine getrennte Phase bilden.

Vorzugsweise wird der in Abhängigkeit von der Voruntersuchung 10 selektierte und anschließend im Rahmen der Hauptuntersuchung näher untersuchte Partikel in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Hauptuntersuchung sortiert und/oder behandelt. Beispielsweise können bei der Hauptuntersuchung verschiedene Zelltypen unterschieden und anschließend entsprechend sortiert werden. 15 Es ist jedoch auch möglich, die im Rahmen der Voruntersuchung selektierten Partikel in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Hauptuntersuchung durch dielektrrophoretische Elemente zu manipulieren, wobei die in der eingangs erwähnten Veröffentlichung von Müller, T. et al. beschriebenen dielektrrophoretischen Elemente Verwendung finden können. 20

Im Rahmen der Voruntersuchung kann beispielsweise eine Durchlichtmessung, eine Fluoreszenzmessung und/oder eine Impedanzspektroskopie erfolgen. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung erfolgt jedoch zunächst eine Durchlichtmessung und anschließend eine Fluoreszenzmessung, wobei die Durchlichtmessung und die Fluoreszenzmessung vorzugsweise in räumlich getrennten Untersuchungsfenstern (engl. "Region of Interest") erfolgen. Die Durchlichtmessung kann beispielsweise die Unterscheidung zwischen lebenden und toten biologischen Zellen ermöglichen, während die Fluoreszenzmessung dazu verwendet werden kann, um zu untersuchen, ob die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel einen Fluoreszenzmarker tragen. 25 30

Falls im Rahmen der Voruntersuchung sowohl eine Durchlichtmessung als auch eine Fluoreszenzmessung in räumlich getrennten Untersuchungsfenstern erfolgt, so ist es vorteilhaft, wenn das Untersuchungsfenster für die Durchlichtmessung im

5 Trägerstrom stromaufwärts vor dem Untersuchungsfenster für die Fluoreszenzmessung liegt. Es ist jedoch alternativ auch möglich, dass das Untersuchungsfenster für die Durchlichtmessung in dem Trägerstrom stromabwärts hinter dem Untersuchungsfenster für die Fluoreszenzmessung angeordnet ist.

10

Vorzugsweise wird im Rahmen der Voruntersuchung der sich mit dem Trägerstrom bewegenden Partikel ein optisches Bild aufgenommen, was eine digitale Bildauswertung zur Klassifizierung der Partikel ermöglicht. Vorzugsweise werden die Partikel

15 hierbei morphologisch untersucht, um beispielsweise eine einzelne biologische Zelle von einem Zellklumpen unterscheiden zu können. Der im Rahmen der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff eines optischen Bildes ist jedoch allgemein zu verstehen und nicht auf zweidimensionale Bilder im herkömmlichen Wortsinne beschränkt. Vielmehr umfasst der Begriff eines optischen Bildes im Sinne der Erfindung auch eine punkt- oder linienförmige optische Abtastung des Trägerstroms bzw. der in dem Trägerstrom suspendierten Partikel. Beispielsweise kann die Helligkeit entlang einer Linie quer zum 20 Trägerstromkanal aufintegriert werden, um einzelne Partikel 25 zu detektieren und zu klassifizieren.

Die Unterscheidung lebender und toter Zellen im Rahmen der Voruntersuchung kann bei einer Durchlichtmessung durch eine 30 Auswertung der Intensitätsverteilung in dem aufgenommenen optischen Bild erfolgen. Ein spezielles Prinzip dieser Durchlichtmessung mit den erwähnten Eigenschaften ist beispielsweise die Phasenkontrast-Beleuchtung. So weisen lebende biologische Zellen eine Ringstruktur mit einem in der Durch-

lichtmessung relativ hellen Rand und einem dunkleren Mittelpunkt auf, wohingegen tote biologische Zellen bei einer Durchlichtmessung eine annähernd einheitliche Helligkeit aufweisen und dunkel gegen den Hintergrund erscheinen.

5

Bei der Hauptuntersuchung der Partikel können beispielsweise bestimmte Moleküle innerhalb einer Zelle lokalisiert werden. Beispielsweise können im Rahmen der Hauptuntersuchung innerhalb einer Zelle Moleküle lokalisiert werden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Bei dem Fluoreszenzfarbstoff kann es sich beispielsweise um molekularbiologisch produzierte "Tags" von "Green Fluorescent Protein" und dessen Derivate, andere autofluoreszente Proteine handeln. Als Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich jedoch auch solche Fluoreszenzfarbstoffe, die an ein zelluläres Molekül kovalent oder nicht-kovalent binden. Darüber hinaus können als Fluoreszenzfarbstoffe auch fluorigene Substanzen eingesetzt werden, die von zellulären Enzymen in fluoreszierende Produkte umgesetzt werden oder sogenannte FRET-Paare (Fluoreszenz Resonanz EnergieTransfer). Der Zustand der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe kann beispielsweise anhand ihrer spektralen Eigenschaften oder durch Bioluminenz unterschieden werden.

Anhand der Lokalisation von Molekülen innerhalb einer Zelle kann auch die Struktur und Funktion der Moleküle ermittelt werden. Hierbei kann beispielsweise unterschieden werden nach dem Vorkommen in der Plasmamembran, im Zytosol, in den Mitochondrien, im Golgi-Apparat, in Endosomen, in Lysosomen, im Zellkern, im Spindelapparat, im Zytoskelett, Kolokalisation mit Aktin, Tubulin.

Ferner kann im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung die Morphologie einer Zelle bestimmt werden, wobei auch Farbstoffe eingesetzt werden können.

Darüber hinaus können im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung auch zwei oder mehr Zustände einer Zellpopulation unterschieden werden.

5 Weiterhin ist es im Rahmen der Hauptuntersuchung möglich, ein zelluläres Signal anhand der Translokation eines fluoreszenzmarkierten Moleküls zu bestimmen, z.B. Rezeptoraktivierung gefolgt von Rezeptor-Internalisierung, Rezeptoraktivierung gefolgt von der Bindung von Arrestin, Rezeptoraggregation,
10 Übergang eines Moleküls von der Plasmamembran ins Zytosol, vom Zytosol in die Plasmamembran, vom Zytosol in den Zellkern oder vom Zellkern ins Zytosol.

Ferner kann im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung
15 auch die Wechselwirkung zweier Moleküle bestimmt werden, wobei vorzugsweise mindestens eines der wechselwirkenden Moleküle einen Fluoreszenzmarker trägt und die Wechselwirkung z.B. durch Kolokalisation zweier Fluoreszenzfarben, ein FRET oder eine Änderung der Fluoreszenz-Lebenszeit gezeigt wird.

20 Im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung kann jedoch auch der Status einer Zelle innerhalb eines Zellzyklus' bestimmt werden, wobei vorzugsweise die Morphologie der Zelle oder die Anfärbung des zellulären Chromatins ausgewertet
25 wird.

Eine weitere Möglichkeit für die Haupt- und/oder Voruntersuchung besteht darin, das Membranpotential einer Zelle zu bestimmen, wobei vorzugsweise membranpotentialsensitive Farbstoffe eingesetzt werden. Vorzugsweise werden hierbei Farbstoffe verwendet, die hinsichtlich des Plasmamembranpotentials und/oder des mitochondrialen Membranpotentials sensitiv sind.

Darüber hinaus kann im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung auch die Vitalität einer Zelle ermittelt werden, wobei vorzugsweise die Morphologie der Zelle ausgewertet wird und/oder fluorogene Substanzen eingesetzt werden, die zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden können.

10 Ferner können bei der Haupt- und/oder Voruntersuchung auch zytotoxische Effekte untersucht und/oder der intrazelluläre pH-Werte bestimmt werden.

15 Es ist auch möglich, im Rahmen der Haupt- und/oder Voruntersuchung die Konzentration eines oder mehrerer Ionen innerhalb einer Zelle zu bestimmen.

20 Auch kann bei der Haupt- und/oder Voruntersuchung eine enzymatische Aktivität innerhalb einer Zelle ermittelt werden, wobei vorzugsweise fluorogene oder chromogene Substanzen, insbesondere Kinasen, Phosphatasen oder Proteasen, eingesetzt werden können.

25 Ferner kann bei der Haupt- und/oder Voruntersuchung die Produktionsleistung von Zellen bestimmt werden, die biologische Produkte erzeugen, wie beispielsweise Proteine, Peptide, Antikörper, Kohlenhydrate oder Fette, wobei eine der beschriebenen Methoden angewendet werden kann.

30 Schließlich können im Rahmen der Hauptuntersuchung auch Zell-Stress-Pfade, metabolische Pfade, Zellwachstums-Pfade, Zellteilungs-Pfade und andere Signaltransduktions-Pfade bestimmt werden.

Darüber hinaus umfasst die Erfindung eine entsprechende Untersuchungseinrichtung zur Ausführung des vorstehend beschriebenen Untersuchungsverfahrens.

Die erfindungsgemäße Untersuchungseinrichtung weist vorzugsweise eine Optik auf, um ein Bild der Partikel aufzunehmen.

Vorzugsweise ist die Optik der erfindungsgemäßen Untersu-

5 chungseinrichtung verstellbar, um die Vergrößerung, den Fokus und/oder das Sehfeld einzustellen oder ein bestimmtes optisches Filter auszuwählen, wobei die Einstellung der Optik durch ein Stellglied (z.B. einen Elektromotor) erfolgen kann.

10 Es wurde bereits vorstehend ausgeführt, dass die Abbremsung der Partikel vorzugsweise durch einen dielektrophoretischen Käfig erfolgt, der an sich bekannt ist. In einem Ausführungsbeispiel der Erfindung dient der dielektrophoretische Käfig jedoch nicht nur zum Abbremsen der suspendierten Partikel für 15 eine Detailuntersuchung, sondern erfüllt auch die Funktion eines Schalters (engl. "Switch") oder einer Weiche, indem die suspendierten Partikel in Abhängigkeit von der Detailuntersuchung durch den Käfig einer von mehreren Ausgangsleitungen zugeführt werden. Hierzu sind die einzelnen Elektroden des 20 dielektrophoretischen Käfigs vorzugsweise unabhängig voneinander ansteuerbar. Darüber hinaus ist der dielektrophoretische Käfig hierzu vorzugsweise an der Verzweigungsstelle der Ausgangsleitungen angeordnet.

25 Darüber hinaus kann in einer oder mehreren der Ausgangsleitungen eine trichterförmige Elektrodenanordnung (engl. "Funnel") angeordnet sein, um ein Absinken der suspendierten Partikel in den Ausgangsleitungen zu verhindern. Dies ist vor- 30 teilhaft, da der Trägerstrom in den Ausgangsleitungen ein Geschwindigkeitsprofil aufweist, das wandnah nur eine geringe Strömungsgeschwindigkeit zeigt, so dass ein Absinken der Partikel in den Ausgangsleitungen zu wandnahen Ablagerungen führen könnte.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die suspendierten Partikel über zwei getrennte Trägerstromleitungen zugeführt werden, die in eine gemeinsame Trägerstromleitung münden. Im Bereich der Mündungsstelle der beiden Trägerstromleitungen kann hierbei in der gemeinsamen Trägerstromleitung eine Trennwand angeordnet sein, welche auch noch in der gemeinsamen Trägerstromleitung zwei getrennte Teilströme voneinander trennt, wobei die beiden Teilströme einer Untersuchung unterzogen werden kann. In Abhängigkeit von dem Ergebnis dieser Untersuchung können die in den beiden Teilströmen suspendierten Partikel dann zusammengeführt werden. Die zusammengeführten Partikel können dann in der vorstehend beschriebenen Weise in einem dielektrophoretischen Käfig fixiert und einer Detailuntersuchung unterzogen werden. Schließlich können die von dem dielektrophoretischen Käfig freigegebenen Zellen dann in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Detailuntersuchung einer von mehreren Ausgangsleitungen zugeführt werden.

Besonders vorteilhaft an der Erfindung ist die Tatsache, dass Zellen unter keimarmen, aseptischen Bedingungen untersucht und entsprechend isoliert werden können.

Andere vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet oder werden nachstehend zusammen mit der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 ein Fluidikdiagramm eines erfindungsgemäßen Zellsortierers mit einem Sortierchip,

Figur 2 den Trägerstromkanal des Sortierchips mit mehreren dielektrophoretischen Elementen,

Figur 3 eine schematische Darstellung der Untersuchungsoptik des Zellsortierers aus Figur 1,

Figur 4 ein Schaubild zur Verdeutlichung der Unterscheidung von toten und lebenden biologischen Zellen,

5

Figur 5a-5e ein Beispiel des erfindungsgemäßen Untersuchungsverfahrens in Form eines Flussdiagramms sowie

10

Figuren 6-9 alternative Ausführungsformen des Trägerstromkanals des Sortierchips mit mehreren dielektrophoretischen Elementen.

15

Die schematische Darstellung in Figur 1 zeigt einen erfindungsgemäßen Zellsortierer, der mittels eines mikrofluidischen Sortierchips 1 biologische Zellen dielektrophoretisch sortiert.

20

Die Techniken der dielektrophoretischen Beeinflussung von biologischen Zellen sind beispielsweise in Müller, T. et al.: "A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles", Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 247-256 beschrieben, so dass im Folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der dielektrophoretischen Prozesse in dem Sortierchip 1 verzichtet wird und diesbezüglich auf die vorstehende Veröffentlichung verwiesen wird.

25

Der Sortierchip 1 weist zur fluidischen Kontaktierung mehrere Anschlüsse 2-6 auf, wobei die fluidische Kontaktierung der Anschlüsse 2-6 in DE 102 13 272 beschrieben ist, deren Inhalt der vorliegenden Beschreibung zuzurechnen ist.

30

Der Anschluss 2 des Sortierchips 1 dient zur Aufnahme eines Trägerstroms mit den zu sortierenden biologischen Zellen, während der Anschluss 3 des Sortierchips 1 zur Abführung der ausselektierten biologischen Zellen dient, die auf dem Sortierchip 1 nicht weiter untersucht werden. Die ausselektierten biologischen Zellen können von einer Saugspritze 7 aufgefangen werden, die an den Anschluss 3 des Sortierchips 1 angeschlossen werden kann. Der Ausgang 5 des Sortierchips 1 dient dagegen zur Abführung der interessierenden biologischen Zellen, die anschließend weiter verarbeitet oder untersucht werden können.

Ferner dienen die Anschlüsse 4 und 6 des Sortierchips 1 zur Zuführung eines sogenannten Hüllstroms, der die Aufgabe hat, die selektierten biologischen Zellen zu dem Anschluss 5 des Sortierchips 1 zu führen. Hinsichtlich der Funktionsweise des Hüllstroms wird auf die deutsche Patentanmeldung DE 100 05 735 verwiesen, so dass im Folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise des Hüllstroms verzichtet werden kann.

Die Anschlüsse 4 und 6 des Sortierchips sind über zwei Hüllstromleitungen 8, 9, ein Y-Stück 10 und ein Vier-Wege-Ventil 11 mit einem Druckbehälter 12 verbunden, in dem sich ein Kultivierungsmedium für den Hüllstrom befindet.

Der Druckbehälter 12 wird über eine Druckluftleitung 13 unter Überdruck gesetzt, so dass die in dem Druckbehälter 12 befindliche Pufferlösung (z.B. ein Kultivierungsmedium) bei einer entsprechenden Stellung des Vier-Wege-Ventils 11 über das Y-Stück 10 und die Hüllstromleitungen 8, 9 zu den Anschlüssen 4, 6 des Sortierchips 1 strömt.

Der Hüllstrom kann jedoch alternativ auch über andere Prinzipien als durch den Druckbehälter 12 mit der Pufferlösung realisiert werden, wie beispielsweise mit einer Spritzenpumpe oder einer peristaltischen Pumpe.

5

Der Anschluss 2 des Sortierchips 1 ist dagegen über eine Trägerstromleitung 14 mit einem Partikelinjektor 15 verbunden.

Stromaufwärts ist der Partikelinjektor 15 über ein T-Stück 16 10 mit einer Trägerstromspritze 17 verbunden, die maschinell angetrieben wird und einen vorgegebenen Flüssigkeitsstrom eines Trägerstroms injiziert.

Darüber hinaus ist das T-Stück 16 stromaufwärts über ein weiteres Vier-Wege-Ventil 18 und eine Hüllstromleitung 19 mit 15 einem Drei-Wege-Ventil 20 verbunden. Das Drei-Wege-Ventil 20 ermöglicht eine Spülung der Hüllstromleitungen 8, 9 sowie der Trägerstromleitung 14 vor dem eigentlichen Betrieb.

20 Hierzu ist das Drei-Wege-Ventil 20 stromaufwärts über eine Peristaltikpumpe 21 mit drei Drei-Wege-Ventilen 22.1-22.3 verbunden, an die jeweils ein Spritzenreservoir 23.1-23.3 angeschlossen ist. Die Spritzenreservoir 23.1-23.3 dienen hierbei zur Zuführung eines Füllstroms zum Spülen des gesamten Fluidiksystems vor dem eigentlichen Betrieb, wobei das Spritzenreservoir 23.1 z.B. 70% Ethanol enthält, während das Spritzenreservoir 23.2 als Füllstromsubstanz vorzugsweise Aqua destillata enthält. Das Spritzenreservoir 23.3 enthält z.B. eine Pufferlösung als Füllstromsubstanz.

25

Ferner weist der Zellsortierer einen Auffangbehälter 27 für überschüssigen Hüllstrom sowie einen Auffangbehälter 28 für überschüssigen Füllstrom auf.

Im Folgenden wird zunächst der Spülvorgang beschrieben, der vor dem eigentlichen Betrieb des Zellsortierers durchgeführt wird, um die Hüllstromleitung 8, 9, die Trägerstromleitung 14 und das restliche Fluidiksystem des Zellsortierers von Luftblasen und Verunreinigungen zu befreien.

Hierzu wird zunächst das Drei-Wege-Ventil 22.1 geöffnet und Ethanol von dem Spritzenreservoir 23.1 als Füllstrom eingespritzt, wobei das Ethanol von der Peristaltikpumpe 21 zuerst zu dem Drei-Wege-Ventil 20 gefördert wird. Das Ethanol dient sowohl zur Reduzierung der Keimzahl im System (für das Einrichten eines aseptischen Analyse- und Selektionsprozesses), als auch zur vollständigen Verdrängung der Luft aus dem fluidischen System.

Während des Spülvorgangs ist das Drei-Wege-Ventil 20 so eingestellt, dass ein Teil des von der Peristaltikpumpe 21 geförderten Füllstroms über die Füllstromleitung 19 weiter geleitet wird, während der restliche Teil des von der Peristaltikpumpe 21 geförderten Füllstroms zu dem Vier-Wege-Ventil 11 gelangt. Die beiden Vier-Wege-Ventile 11, 18 sind wiederum so eingestellt, dass der Füllstrom durch die Hüllstromleitungen 8, 9 und die Trägerstromleitung 14 durchgeleitet wird. Weiterhin fliesst Kultivierungsmedium aus dem Druckbehälter 12 in den Auffangbehälter 27, um die Leitungen kurz zu fluten.

Nach der vorstehend beschriebenen Spülung des Zellsortierers mit Ethanol erfolgt in der gleichen Weise eine Spülung mit Aqua destillata bzw. Pufferlösung, wobei jeweils die Drei-Wege-Ventile 22.2 bzw. 22.3 geöffnet werden.

Bei dem vorstehend beschriebenen Spülvorgang kann überschüssiger Füllstrom von dem Vier-Wege-Ventil 18 in den Auffangbehälter 28 abgeleitet werden.

5 Nach dem Spülvorgang werden die Drei-Wege-Ventile 22.1-22.3 geschlossen und die Peristaltikpumpe 21 abgeschaltet..

Zur Einleitung des Sortierbetriebs wird das Vier-Wege-Ventil 11 so eingestellt, dass der Druckbehälter 12 mit dem 10 Y-Stück 10 verbunden wird, so dass das in dem Druckbehälter 12 befindliche Kultivierungsmedium aufgrund des in dem Druckbehälter 12 herrschenden Überdrucks in die Hüllstromleitungen 8, 9 gedrückt wird.

15 Weiterhin wird während des Sortierbetriebs das Vier-Wege-Ventil 18 so eingestellt, dass keine Strömungsverbindung zwischen dem T-Stück 16 und dem Vier-Wege-Ventil 18 besteht.

Der von der Trägerstromspritze 17 eingespritzte Trägerstrom 20 fließt dann über das T-Stück 16 in den Partikelinjektor 15, wobei durch eine weitere Injektionsspritze 29 biologische Zellen in den Trägerstrom eingespritzt werden. Anschließend fließt der Trägerstrom mit den injizierten biologischen Zellen von dem Partikelinjektor 15 über die Trägerstromleitung 14 zu dem Anschluss 2 des Sortierchips.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass an dem Partikelinjektor 15 ein Temperatursensor 30 angebracht ist, um die Temperatur T des Partikelinjektors 15 zu messen.

30 Darüber hinaus befindet sich sowohl an dem Partikelinjektor 15 als auch an der Aufnahme für den Sortierchip 1 ein Temperierelement 31 in Form eines Peltier-Elements, um den

Partikelinjektor 15 und den Sortierchip 1 beheizen oder ab-
kühlen zu können.

Die Heiz- bzw. Kühnergie Q wird hierbei von einem Tempera-
5 turregler 32 vorgegeben, der eingangsseitig mit dem Tempera-
tursensor 30 verbunden ist und die Temperatur T des Partikel-
injektors 15 auf einen vorgegebenen Sollwert einregelt.

10 Im Folgenden wird nun unter Bezugnahme auf Figur 2 ein Trä-
gerstromkanal 33 beschrieben, der in dem Sortierchip 1 des
Zellsortierers angeordnet ist und in zwei Ausgangsleitungen
34, 35 verzweigt, wobei die Ausgangsleitung 34 mit dem An-
schluss 5 des Sortierchips 1 verbunden ist und zur Weiterlei-
tung der positiv selektierten Partikel dient, während die
15 Ausgangsleitung 35 mit dem Anschluss 3 des Sortierchips 1
verbunden ist und zum Abführen der ausselektierten Partikel
dient.

20 In dem Trägerstromkanal 33 ist stromabwärts hinter dem An-
schluss 2 des Sortierchips 1 eine trichterförmige die-
lektrophoretische Elektrodenanordnung 36 angeordnet, welche
die Aufgabe hat, die in dem Trägerstrom suspendierten Parti-
kel in dem Trägerstromkanal 33 hintereinander aufzurühen.

25 Der genaue technische Aufbau und die Funktionsweise der
Elektrodenanordnung 36 ist in der eingangs erwähnten Veröf-
fentlichung von Müller, T. et al. beschrieben, deren Inhalt
der vorliegenden Beschreibung zuzurechnen ist, so dass im
Folgenden auf eine detaillierte Beschreibung der Elektroden-
anordnung 36 verzichtet werden kann.

30 Stromabwärts hinter der Elektrodenanordnung 36 ist in dem
Trägerstromkanal 33 ein dielektrrophoretischer Käfig 37 ange-
ordnet, der es ermöglicht, die in dem Trägerstrom 33 suspen-
dierten Partikel zu fangen und für eine eingehende Untersu-

chung in einem Untersuchungsfenster UF zu fixieren. Hinsichtlich des Aufbaus und der Funktion des dielektrophoretischen Käfigs 37 wird ebenfalls auf die eingangs zitierte Veröffentlichung von Müller, T. et al. verwiesen, so dass diesbezüglich auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet werden kann.

In einem Verzweigungsbereich des Trägerstromkanals 33 stromabwärts hinter dem dielektrophoretischen Käfig 37 befindet sich eine Sortiereinrichtung, die aus einer dielektrophoretischen Elektrodenanordnung 38 besteht, wobei hinsichtlich des Aufbaus und der Funktionsweise der Elektrodenanordnung 38 ebenfalls auf die eingangs zitierte Veröffentlichung von Müller, T. et al. verwiesen wird. Die Elektrodenanordnung 38 sortiert die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel entweder in die Ausgangsleitung 34 oder in die Ausgangsleitung 35, wobei die Selektion in Abhängigkeit von einer an den in dem Käfig 37 fixierten Partikeln durchgeführten Hauptuntersuchung erfolgt, wie noch detailliert beschrieben wird.

Ferner ist im Verzweigungsbereich der Trägerstromleitung 33 eine Strömungsleiteinrichtung angeordnet, die ebenfalls aus einer dielektrophoretischen Elektrodenanordnung 39 besteht und die Aufgabe hat, eine Rückströmung von Partikeln aus der Ausgangsleitung 35 in die Ausgangsleitung 34 zu verhindern. Hierzu ist die Elektrodenanordnung 39 v-förmig ausgebildet und weist zwei Schenkel auf, wobei der eine Schenkel der Elektrodenanordnung 39 in die Ausgangsleitung 34 hinein ragt, während der andere Schenkel der Elektrodenanordnung 39 in die Ausgangsleitung 35 hineinragt.

Im Folgenden wird nun anhand der Figuren 2 und 3 beschrieben, wie die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in dem Sortierchip 1 untersucht werden.

Im Rahmen einer Voruntersuchung der Partikel erfolgt zunächst eine Durchlichtmessung in einem Untersuchungsfenster ROI1 (region of interest 1) sowie eine Fluoreszenzmessung in einem weiteren Untersuchungsfenster ROI2 (region of interest 2) wo-
5 bei das Untersuchungsfenster ROI1 in dem Trägerstromkanal 33 stromaufwärts vor dem Untersuchungsfenster ROI2 für die Fluoreszenzmessung angeordnet ist.

10 Sowohl die Durchlichtmessung als auch die Fluoreszenzmessung erfolgt hierbei durch die in Figur 3 schematisch dargestellte Detektionseinheit D, die zur Bilderfassung eine CCD-Kamera 40 aufweist, die unterhalb des Sortierchips 1 angeordnet und auf einen Umlenkspiegel 41 ausgerichtet ist.

15 Oberhalb des Sortierchips 1 ist als Lichtquelle für die Durchlichtmessung eine Leuchtdiode 42 angeordnet, wobei sich zwischen der Leuchtdiode 42 und dem Sortierchip 1 ein Konden-
sor 43 befindet, der beispielsweise eine Phasenkontrastblende aufweisen kann.

20 Unterhalb des Sortierchips 1 ist im Strahlengang des Konden-
sors 43 ein Objektiv 44 angeordnet.

Bei der Durchlichtmessung nimmt die CCD-Kamera 40 also über
25 den Umlenkspiegel 41 und das Objektiv 44 ein Bild des Unter-
suchungsfensters ROI1 auf.

Weiterhin weist die Detektionseinheit D mehrere elektromoto-
rische Stellglieder 45.1-45.3 auf, die eine Verstellung des
30 Objektivs 44, des Filterblocks 47 bzw. des Umlenkspiegels 41 ermöglichen. Die Verstellung des Objektivs 44 ermöglicht hierbei eine Änderung der Vergrößerung und des Fokus. Der Filterblock 47 kann dagegen verstellt werden, um unterschied-
liche Filter auszuwählen. Die Verstellung des Umlenkspie-

gels 41 hat dagegen den Zweck, das Sehfeld entlang dem Trägerstromkanal 33 zu verschieben, um etwaige Ablagerungen in dem Trägerstromkanal 33 erkennen zu können.

5 Zur Fluoreszenzanregung bei der Fluoreszenzmessung weist die Detektionseinheit D eine Lichtquelle 46 (z.B. ein Laser) auf, die über einen Filterblock 47 eine Fluoreszenzanregung der in der Trägerstromleitung 33 suspendierten biologischen Zellen ermöglicht, wobei die CCD-Kamera 40 ein entsprechendes Fluoreszenzbild aufnimmt.

10 Im Folgenden werden anhand von Figur 4 die unterschiedlichen Erscheinungsformen biologischer Zellen in dem Durchleuchtungsbild beschrieben. So zeigt die Darstellung in Figur 4 im oberen Bereich eine lebende Zelle 48 sowie eine tote Zelle 49 und im unteren Bereich die zugehörigen Intensitätsverläufe 50, 51 in dem Durchleuchtungsbild. Daraus ist erkennbar, dass 15 die lebende Zelle 48 einen relativ dunklen Kern aufweist, während hingegen die tote Zelle 49 im Inneren gleichmäßig ausgeleuchtet ist, was eine Unterscheidung der lebenden Zelle 48 von 20 der toten Zelle 49 ermöglicht, wie noch detailliert beschrieben wird.

25 Im Folgenden wird nun anhand des in den Figuren 5a bis 5e dargestellten Flußdiagramms das erfindungsgemäße Untersuchungsverfahren beschrieben.

30 Zu Beginn des Verfahrens werden zunächst die Trägerstromleitung 14 und die Hüllstromleitungen 8, 9 mit einer 70%-igen Ethanollösung, anschließend mit Aqua destillata und schließlich mit einer Pufferlösung gespült, um das Fluidiksystem des Zellsortierers zu reinigen und insbesondere von Luftblasen und Verschmutzungen zu befreien.

Anschließend wird dann aus der Trägerstromspritze 17 der Trägerstrom in die Trägerstromleitung 14 eingespritzt, wobei nach der Zufuhr des Hüllstroms wie nachfolgend beschrieben die zu untersuchenden biologischen Zellen von der Injektions-
5 spritze 29 an dem Partikelinjektor 15 in den Trägerstrom eingespritzt werden.

Weiterhin wird das in dem Druckbehälter 12 befindliche Kultivierungsmedium für den Hüllstrom durch die über die Druckluftleitung 13 zugeführte Druckluft aus dem Druckbehälter 12 heraus in die Hüllstromleitungen 8, 9 gedrückt, die in die Anschlüsse 4 bzw. 6 des Sortierchips 1 münden und die Weiterleitung der in dem Sortierchip 1 selektierten Partikel über den Anschluss 5 des Sortierchips 1 unterstützen.
10

15 In dem Trägerstromkanal 33 des Sortierchips 1 werden die suspendierten Partikel zunächst durch die Elektrodenanordnung 36 in Strömungsrichtung hintereinander aufgereiht, wie schematisch durch einen gestrichelten Pfeil angedeutet ist.

20 Anschließend werden in dem Untersuchungsfenster ROI1 zeitlich hintereinander mehrere Phasenkontrastbilder B_1, \dots, B_n aufgenommen, um die Bewegungsgeschwindigkeit der suspendierten Partikel zu ermitteln und lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wie nachfolgend detailliert beschrieben wird.
25

Zur Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit der suspendierten Partikel wird für jedes der Phasenkontrastbilder B_1, \dots, B_n jeweils ein Intensitätssignal I_1, \dots, I_n ermittelt, indem die Bildintensität in den Phasenkontrastbildern B_1, \dots, B_n spaltenweise d.h. rechtwinklig zur Strömungsrichtung, aufintegriert wird. Die einzelnen Intensitätssignale I_1, \dots, I_n weisen also jeweils an der Stelle einer biologischen Zelle eine Signalspitze auf, wobei sich eine Signalspitze zwischen den In-
30

tensitätssignalen I_1, \dots, I_n entsprechend der Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen und dem zeitlichen Abstand zwischen den Intensitätssignalen I_1, \dots, I_n verschiebt.

5 Anschließend wird für zeitlich aufeinander folgende Intensitätssignale I_i, I_{i+1} jeweils eine Kreuzkorrelationsfunktion φ_i berechnet. Die Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion φ_i dient zur Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen in dem Trägerstromkanal 33 des Sortierchips 1, damit der die-
10 lektrophoretische Käfig 37 im richtigen Zeitpunkt angesteuert werden kann, um eine bestimmte Zelle zu fangen.

Anschließend werden für die einzelnen Kreuzkorrelationsfunktionen $\varphi_i(x)$ in Abhängigkeit von der Verschiebung x in Längs-
15 richtung des Trägerstromkanals 33 die Maxima berechnet.

Die Bewegungsgeschwindigkeit v der Zellen in dem Trägerstromkanal 33 ergibt sich daraus als Quotient aus dem Mittelwert der Maxima der Kreuzkorrelationsfunktionen und dem zeitlichen Abstand zwischen den aufeinander folgenden Phasenkontrastbil-
20 dern B_1, \dots, B_n .

Die Bewegungsgeschwindigkeit v der Zellen kann im Rahmen einer Rückkopplung zur Pumpensteuerung verwendet werden, d.h. zur Kontrolle, ob berechnete und tatsächliche Pumprate übereinstimmen und wie ggf. nachgeregelt werden muss. Insbesondere kann anhand der Bewegungsgeschwindigkeit v erkannt werden, ob es Störungen im System gibt, aufgrund derer die Zellen zu langsam fliessen (Verstopfung), stehenbleiben oder sogar rückwärts fliessen. Alle diese Störungen können so erkannt und behoben werden, z.B. durch Spülen des Systems.

Die vorstehend beschriebene Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit v der Zellen kann jedoch alternativ auch außerhalb

der Untersuchungsfenster ROI1, ROI2 erfolgen. Grundsätzlich ist eine Verfolgung der Zellbewegung (engl.: "Cell Tracking") innerhalb des gesamten Trägerstromkanals 33 oder beliebiger Bereiche des Trägerstromkanals 33 möglich.

5

Darüber hinaus liefert die Signalform der Intensitätssignale I_1, \dots, I_n Informationen über die Größe der Partikel und eine etwaige Aggregatbildung. Insgesamt ist die Auswertung der Intensitätssignale wichtig für die Steuerung und Automatisierung der gesamten Anlage, nämlich der Pumpen, der dielektrrophoretischen Elektrodenelemente (z.B. wann erfolgt "Caging" und wann "Switching"), der detaillierten Bildaufnahme in dem Käfig 37 und der Probenablage.

10 15 In einem weiteren Schritt wird dann der Fangzeitpunkt t_F berechnet, zu dem der Käfig 37 angesteuert werden muss, um den untersuchten Partikel für die anschließende Hauptuntersuchung in dem Untersuchungsfenster UF zu fangen. Der Fangzeitpunkt t_F ergibt sich hierbei einfach aus der Bewegungsgeschwindigkeit v des Partikels und dem Abstand zu dem Käfig 37.

20

Ferner wird in einem weiteren Schritt der Partikelabstand d_p zwischen benachbarten Partikeln ermitteln. Dies ist wichtig für die Unterscheidung zwischen einer einzelnen Zelle und einem Zellaggregat, wie noch detailliert beschrieben wird.

25 Im Folgenden wird nun der in Figur 5c beschriebene Verfahrensabschnitt erläutert, in dem eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen erfolgt. Hierzu werden jeweils Zellrandpunkte x_l, x_r ermittelt, bei denen die Intensität in dem Phasenkontrastbild einen vorgegebenen Grenzwert I_{TH} überschreitet.

Anschließend wird überprüft, ob sich zwischen den Zellrandpunkten x_1 , x_r ein Intensitätsminimum befindet. Falls dies der Fall ist und eine Mindestintensität vorhanden ist, so handelt es sich bei der Zelle um eine lebende Zelle, wie aus 5 Figur 4 ersichtlich ist. Andernfalls wird die Zelle dagegen als tot klassifiziert, um nachfolgend eine entsprechende Selektion vorzunehmen, wie noch detailliert beschrieben wird.

Nach der vorstehend beschriebenen Unterscheidung von toten 10 und lebenden Zellen wird in dem Verfahrensabschnitt in Figur 5d die Leuchtdichte L der einzelnen Zellen ermittelt, indem die Intensität I einer Zelle zwischen den Zellrandgruppen x_1 und x_r aufintegriert wird.

15 Anschließend wird die so ermittelte Leuchtdichte L der Zelle mit einem Minimalwert L_{\min} und einem Maximalwert L_{\max} verglichen.

20 Falls sich die ermittelte Leuchtdichte der Zelle innerhalb dieses Fensters befindet, so wird die Durchlichtbeleuchtung ausgeschaltet und die Fluoreszenzanregung durch die Lichtquelle 46 eingeschaltet. Anschließend wird dann ein Fluoreszenzbild in dem Untersuchungsfenster ROI2 aufgenommen und die Fluoreszenz I_F der Zelle gemessen.

25 Es ist jedoch auch möglich, dass die Fluoreszenzanregung dauerhaft angeschaltet ist, wobei lediglich die Durchlichtbeleuchtung ausgeschaltet wird, wenn sich die ermittelte Leuchtdichte der Zelle innerhalb der vorstehend erwähnten 30 Fensters befindet.

Falls die gemessene Fluoreszenz I_F der Zelle einen vorgegebenen Grenzwert I_{\min} überschreitet, so deutet dies darauf hin, dass die betreffende Zelle einen Fluoreszenzmarker trägt.

Falls die gemessene Fluoreszenz I_F dagegen den vorgegebenen Grenzwert I_{min} unterschreitet, so kann davon ausgegangen werden, dass die betreffende Zelle keinen Fluoreszenzmarker trägt.

5

In dem in Figur 5e dargestellten Verfahrensabschnitt werden dann bestimmte Zellen selektiert, wobei die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen sowie die Überprüfung auf einen Fluoreszenzmarker berücksichtigt wird. Beispielsweise 10 können solche Zellen selektiert werden, die lebend sind und einen Fluoreszenzmarker tragen, wohingegen andere Zellen ausselektiert werden.

In einem weiteren Schritt erfolgt dann eine Unterscheidung 15 von einzelnen Zellen einerseits und Zellaggregaten andererseits, indem der zuvor ermittelte Partikelabstand d_p mit einem vorgegebenen Minimalwert d_{MIN} verglichen wird. Beim Unterschreiten des Minimalwerts d_{MIN} wird davon ausgegangen, dass 20 der Partikel ein Zellaggregat ist, so dass das Verfahren beendet wird. Falls der Partikelabstand d_p den vorgegebenen Minimalwert d_{MIN} dagegen überschreitet, so wird davon ausgegangen, dass der Partikel eine einzelne Zelle ist und das Verfahren wird mit den nachfolgend beschriebenen Schritten fortgeführt.

25

Die auf diese Weise selektierten Zellen werden dann zu dem vorbestimmten Fangzeitpunkt t_F in dem dielektrrophoretischen Käfig 37 gefangen und dadurch fixiert, so dass anschließend eine Hauptuntersuchung der gefangenen Zelle mit einer höheren 30 Auflösung und einer größeren Belichtungszeit möglich ist.

Die selektierten Zellen, d.h. in der Regel die lebenden und mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Zellen, werden dann von der Elektrodenanordnung 38 in die Ausgangsleitung 34 wei-

terglossen, wohingegen die ausselektierten Zellen (z.B. tote Zellen) in die Ausgangsleitung 35 befördert werden.

Bei der Hauptuntersuchung in dem Untersuchungsfenster UF kann 5 es sich um Bilder mit Fluoreszenzanregung handeln, wobei eine oder mehrere Anregungswellenlängen gleichzeitig oder zeitlich versetzt zum Einsatz kommen. Hierzu werden in dem Filterblock 47 geeignete dichroitische Spiegel verwendet. Dabei wird das Fluoreszenzlicht von einer oder mehreren Wellenlängen gleich- 10 zeitig auf eine oder mehrere Kameras geleitet. Hierzu werden geeignete Emissions-Filttereinsätze in dem Filterblock 47 oder auch geeignete Emissions-Splitter verwendet. So ist es mög- lich, gleichzeitig oder hintereinander weg Bilder bei mehre- 15 ren Fluoreszenzfarben von der selektierten Zelle zu erzeugen. Weiterhin ist es möglich, ein Bild der selektierten Zelle bei einer Weisslicht-Phasenkontrastbeleuchtung zu erzeugen. Dies ist erforderlich, um festzustellen, ob an einer fluoreszenz- 20 markierten Zelle noch eine oder mehrere nicht fluoreszenzmar- kierte Zellen anhaften, was zu einer - in der Regel uner- wünschten - Verunreinigung dieser einen fluoreszenzmarkierten Zelle führt.

Das in Figur 6 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weit- gehend mit dem in Figur 2 dargestellten Ausführungsbeispiel 25 überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden für entsprechende Bauteile dieselben Bezugszeichen verwendet wer- den, die zur Unterscheidung lediglich durch einen Apostroph gekennzeichnet sind.

30

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht in der einfacheren konstruktiven Gestaltung der in dem Trägerstrom- kanal 33' eingangsseitig angeordneten dielektrophoretischen Elektrodenanordnung 36', welche die in dem Trägerstrom sus-

pendierten Partikel in dem Trägerstromkanal 33' hintereinander aufreihrt.

Eine weitere Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht 5 darin, dass in dem Trägerstromkanal 33' stromabwärts hinter der Elektrodenanordnung 36' eine hakenförmige Elektrodenanordnung 52' angeordnet ist, die entsprechend ihrer Form auch als "Hook" bezeichnet wird und die Aufgabe hat, Partikel festzuhalten und quasi zu parken. Der genaue Aufbau und die 10 Funktionsweise der Elektrodenanordnung 52' ist beispielsweise in Müller, T. et al.: "Life Cells in Cellprocessors" in Bioworld 2-2002 beschrieben, so dass hier auf eine detaillierte Beschreibung der Elektrodenanordnung 52' verzichtet werden kann und der Inhalt der vorstehenden Druckschrift dieser 15 Beschreibung in vollem Umfang zuzurechnen ist.

In dem Trägerstromkanal 33' befindet sich zwischen der Elektrodenanordnung 52' und dem dielektrophoretischen Käfig 37' ein Untersuchungsfenster 53', um die vorstehend bezüglich der 20 Untersuchungsfenster ROI1 und ROI2 beschriebene Voruntersuchung durchzuführen.

Ein weiteres Untersuchungsfenster 54' befindet sich hierbei 25 in dem dielektrophoretischen Käfig 37', so dass in dem dielektrophoretischen Käfig 37' eine Untersuchung der abgebremsten Partikel durchgeführt werden kann.

Eine weitere Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht 30 darin, dass in der Ausgangsleitung 34' für die positiv selektierten Partikel eine trichterförmige Elektrodenanordnung 55' angeordnet ist, deren Funktion der Elektrodenanordnung 36' entspricht und welche die Aufgabe hat, die Partikel in der Ausgangsleitung 34' zu zentrieren. Dies ist vorteilhaft, da die Partikel in der Ausgangsleitung 34' die Tendenz zum Ab-

sinken haben und sich deshalb wandnah ablagern können, wo die Strömungsgeschwindigkeit gering ist. Die Elektrodenanordnung 55' verhindert ein derartiges Absinken der Partikel und hält die Partikel dadurch in der Mitte der Ausgangsleitung 34', wo 5 die Strömungsgeschwindigkeit maximal ist.

Ferner ist zu erwähnen, dass die Elektrodenanordnungen 36', 52' sowie der dielektrophoretische Käfig 37' in der Trägerstromleitung 33' außermittig angeordnet sind. Dies hat zur 10 Folge, dass die in dem Trägerstrom enthaltenen Partikel nach der Freigabe durch den dielektrophoretischen Käfig 37' automatisch in die Ausgangsleitung 35' für negativ selektierte Partikel gelangen, wenn die Elektrodenanordnung 38' nicht angesteuert wird. Dies bietet den Vorteil, dass die Elektrodenanordnung 38' nur selten angesteuert werden muss, wenn in dem 15 Trägerstrom nur wenig Partikel enthalten sind, die positiv selektiert werden sollen.

Das in Figur 7 dargestellte alternative Ausführungsbeispiel 20 stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 6 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden für entsprechende Bauteile dieselben Bezugszeichen verwendet werden, die zur Unterscheidung durch zwei Apostrophe gekennzeichnet sind. 25

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass der dielektrophoretische Käfig 37" an der Stelle angeordnet ist, an der der Trägerstromkanal 33" in die beiden 30 Ausgangsleitungen 34", 35" verzweigt. Darüber hinaus sind die einzelnen Elektroden des dielektrophoretischen Käfigs 37" hierbei getrennt ansteuerbar, so dass der dielektrophoretische Käfig 37" zwei Funktionen ausführen kann, nämlich zum einen die Funktion eines Käfigs (engl. "Cage") und zum

anderen die Funktion eines Schalters (engl. "Switch") bzw. einer Weiche. Der dielektrophoretische Käfig 37" kann die Partikel in dem Trägerstrom also zum einen für die Untersuchung in dem Untersuchungsfenster 54" fixieren und die Partikel zum anderen einer der beiden Ausgangsleitungen 34", 35" zuführen.

Der im Rahmen der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff einer Verzweigungsstelle ist allgemein zu verstehen und nicht auf den geometrischen Schnittpunkt der Ausgangsleitungen beschränkt. Es ist vielmehr auch möglich, dass der Käfig 37" bzw. die Weiche stromaufwärts vor dem Schnittpunkt der Ausgangsleitungen angeordnet ist. Beispielsweise umfasst der Begriff einer Verzweigungsstelle auch den sogenannten "Separatrix". Dabei handelt es sich um die Trennungsline der laminaren Strömung in dem Trägerstromkanal.

Darüber hinaus sind die Elektrodenanordnungen 36", 52", der Käfig 37" und die Messstationen 53", 54" hierbei sowie in den folgenden Ausführungsbeispielen in dem Trägerstromkanal 33" mittig angeordnet.

Das in Figur 8 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 7 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden für entsprechende Bauteile dieselben Bezugszeichen verwendet werden, die jedoch zur Unterscheidung durch drei Apostrophe gekennzeichnet sind.

30

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht in der konstruktiven Gestaltung des dielektrophoretischen Käfigs 37'", der hier nur aus sechs räumlich angeordneten Elektroden besteht, wobei die einzelnen Elektroden getrennt ansteuerbar

sind, damit der Käfig 37''' wahlweise als Schalter bzw. Weiche oder als Käfig fungieren kann.

Figur 9 zeigt schließlich ein weiteres Ausführungsbeispiel

5 einer möglichen Anordnung in einem Sortierchip. Hierbei münden zwei Trägerstromleitungen 56, 57 in eine gemeinsame Trägerstromleitung 58, wobei über die beiden Trägerstromleitungen 56, 57 jeweils suspendierte Partikel zugeführt werden.

10 In den beiden Trägerstromleitungen 56, 57 ist jeweils eine trichterförmige Elektrodenanordnung 59, 60 angeordnet, um die in den Trägerströmen der beiden Trägerstromleitungen 56, 57 enthaltenen Partikel zu zentrieren.

15 In dem gemeinsamen Trägerstromkanal 58 befindet sich stromaufwärts an der Mündungsstelle der beiden Trägerstromleitungen 56, 57 eine Trennwand 61, so dass die in den Trägerströmen der beiden Trägerstromleitungen 56, 57 suspendierten Partikel in der Trägerstromleitung 58 zunächst parallel neben-
20 einander und getrennt voneinander geführt werden.

Im Bereich der Trennwand 61 befinden sich in der Trägerstromleitung 58 zwei Untersuchungsfenster 62, 63, um die suspendierten Partikel während des Vorbeiströmens einer Voruntersuchung zu unterziehen, wobei die Voruntersuchung beispielsweise in der vorstehend zu Figur 2 beschriebenen Weise folgen kann.

Stromabwärts hinter den beiden Untersuchungsfenstern 62, 63 befindet sich in der Trägerstromleitung 58 eine trichterförmige Elektrodenanordnung 64, welche die in den beiden Teilströmen beiderseits der Trennwand 61 suspendierten Partikel zentriert und einem dielektrophoretischen Käfig 65 zuführt,

dér die Partikel für eine Untersuchung in einem weiteren Untersuchungsfenster 66 fixieren kann.

Stromabwärts hinter dem dielektrophoretischen Käfig 65 befindet sich eine weitere Elektrodenanordnung 67, welche die in dem Trägerstrom suspendierten Partikeln nach der Freigabe durch den Käfig 65 in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Untersuchung in dem Untersuchungsfenster 66 einer von drei Ausgangsleitungen 68, 69, 70 zuführt. Die Ausgangsleitungen 68, 10 70 dienen hierbei zur Abführung der negativ selektierten Partikel, während die Ausgangsleitung 69 der Weiterführung der positiv selektierten Partikel dient. Die Elektrodenanordnung 67 muss also aktiv angesteuert werden, wenn Partikel in die Ausgangsleitungen 68, 70 für die negativ selektierten Partikel befördert werden sollen, wohingegen keine Ansteuerung für die positiv selektierten Partikel erfolgt. Diese Anordnung eignet sich deshalb besonders bei solchen Untersuchungen, bei denen nur wenige Partikel negativ selektiert werden.

20 Die Erfindung ist nicht auf die vorstehend beschriebenen bevorzugten Ausführungsbeispiele beschränkt. Vielmehr ist eine Vielzahl von Varianten und Abwandlungen möglich, die ebenfalls von dem Erfindungsgedanken Gebrauch machen und deshalb in den Schutzbereich fallen.

25

16059/PCT

Patentansprüche

5 1. Untersuchungsverfahren für Partikel (48, 49), insbesondere für biologische Partikel (48, 49), mit den folgenden Schritten:

- Einbringung der zu untersuchenden Partikel (48, 49) mindestens in einen Trägerstrom,
- 10 - Durchführung mindestens einer ersten Untersuchung der sich mit dem Trägerstrom bewegenden Partikel (48, 49),
- Selektion mindestens eines Partikels (48, 49) in Abhängigkeit von dem Ergebnis der ersten Untersuchung,
- Abbremsen des selektierten Partikels (48, 49),
- 15 - Durchführung mindestens einer zweiten Untersuchung des selektierten Partikels (48, 49) im abgebremsten Zustand.

2. Untersuchungsverfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der selektierte Partikel (48, 49) in Abhängigkeit von dem Ergebnis der zweiten Untersuchung sortiert und/oder behandelt wird.

3. Untersuchungsverfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der ersten Untersuchung und/oder im Rahmen der zweiten Untersuchung eine Durchlichtmessung und/oder eine Fluoreszenzmessung erfolgt.

4. Untersuchungsverfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Durchlichtmessung in einem ersten Untersuchungsfenster (ROI1) und die Fluoreszenzmessung in einem zweiten Untersuchungsfenster (ROI2) durchgeführt wird, wobei die beiden Untersuchungsfenster (ROI1, ROI2) räumlich voneinander getrennt sind.

5. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der ersten Untersuchung mindestens ein optisches Bild der Partikel (48, 49) aufgenommen wird.

5

6. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der ersten Untersuchung eine elektrische und/oder elektromagnetische Analyse durchgeführt wird.

10

7. Untersuchungsverfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der ersten Untersuchung eine Impedanzanalyse durchgeführt wird.

15

8. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Partikel (48, 49) bei der ersten Untersuchung und/oder bei der zweiten Untersuchung morphologisch und/oder hinsichtlich ihrer Größe untersucht werden.

20

9. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der ersten Untersuchung überprüft wird, ob die Partikel (48, 49) in dem Trägerstrom jeweils aus einer einzelnen biologischen Zelle oder aus mehreren biologischen Zellen bestehen, wobei solche Partikel (48, 49) für die zweite Untersuchung selektiert werden, die aus einer einzigen biologischen Zelle bestehen.

25

10. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der ersten Untersuchung überprüft wird, ob die Partikel (48, 49) in dem Trägerstrom lebende Zellen (48) oder tote Zellen (49) sind.

30

11. Untersuchungsverfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Rahmen der ersten Untersuchung eine Durchlichtmessung der Partikel (48, 49) erfolgt, wobei ein optisches Bild der Partikel (48, 49) aufgenommen und die Intensitätsverteilung (50, 51) in dem Bild der Partikel (48, 49) ausgewertet wird.

12. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der ersten Untersuchung durch eine Fluoreszenzmessung überprüft wird, ob die Partikel (48, 49) in dem Trägerstrom eine bestimmte Schwelle für einen Fluoreszenzmarker überschreiten.

13. Untersuchungsverfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der durch die erste Untersuchung selektierte Partikel (48, 49) zum Abbremsen in einem Feldkäfig (37, 37', 37'', 37''', 65) fixiert und/oder der Trägerstrom verlangsamt wird.

14. Untersuchungseinrichtung zur Untersuchung von Partikeln (48, 49), insbesondere von biologischen Partikeln (48, 49), mit

- einem Trägerstromkanal (33, 33', 33'', 33''', 58) zur Aufnahme eines Trägerstroms mit den darin suspendierten Partikeln (48, 49),
- einer ersten Messstation (ROI1, ROI2, 53', 53'', 53''', 62, 63) zur Durchführung einer ersten Untersuchung der sich mit dem Trägerstrom bewegenden Partikel (48, 49),
- einer Selektionseinheit (37, 37', 37'', 37''', 65) zur Selektion von Partikeln in Abhängigkeit von dem Ergebnis der ersten Untersuchung,

wobei die Selektionseinheit (37, 37', 37'', 37''', 65) eine Bremseinrichtung (37, 37', 37'', 37''', 65) zum Abbremsen der selektierten Partikel (48, 49) aufweist,

- sowie mit einer zweiten Messstation (UF, 54', 54'', 54''', 66) zur Durchführung einer zweiten Untersuchung der selektierten Partikel (48, 49) im abgebremsten Zustand.

5 15. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die zweite Messstation (UF, 54', 54'', 54''', 66) stromabwärts hinter der ersten Messstation (ROI1, ROI2, 53', 53'', 53''') angeordnet ist.

10 16. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** stromabwärts hinter der zweiten Messstation (UF, 54', 54'', 54''', 66) eine Behandlungseinrichtung und/oder eine Sortiereinrichtung (38, 38', 67) angeordnet ist, um die selektierten Partikel (48, 49) in Abhängigkeit von dem Ergebnis der ersten und/oder der zweiten Untersuchung zu behandeln und/oder zu sortieren.

15 17. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Trägerstromkanal (33, 33', 33'', 33''', 58) stromabwärts hinter der zweiten Messstation (UF, 54', 54'', 54''', 66) in mindestens zwei Strömungskanäle (34, 34', 34'', 34''', 35, 35', 35'', 35''') verzweigt ist, wobei die Sortiereinrichtung (38, 38', 37'', 37''') im Verzweigungsbereich des Trägerstromkanals (33, 33', 33'', 33''', 58) angeordnet ist.

20 18. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sortiereinrichtung (38) eine dielektrische Weiche aufweist, die im Verzweigungsbereich des Trägerstromkanals (33, 33', 33'', 33''', 58) angeordnet ist.

25 19. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 17 oder 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** im Verzweigungsbereich des Trägerstromkanals (33, 33', 33'', 33''', 58) eine Strömungsleitein-

richtung (39) angeordnet ist, um eine Rückströmung des Trägerstroms und/oder der Partikel (48, 49) von einem der beiden Strömungskanäle (34, 35) in den anderen Strömungskanal (34, 35) zu verhindern.

5

20. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Strömungsleiteinrichtung (39) eine Elektrode aufweist.

10

21. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Elektrode der Strömungsleiteinrichtung (30) im wesentlichen v-förmig ausgebildet ist und zwei Schenkel aufweist, die sich im wesentlichen in Richtung der beiden abzweigenden Strömungskanäle (34, 35) erstrecken.

15

22. Untersuchungseinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bremseinrichtung (37, 37', 37'', 37''', 65) einen dielektrischen Käfig aufweist.

20

23. Untersuchungseinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem Trägerstromkanal (33, 33', 33'', 33''', 58) stromaufwärts vor der ersten Messstation (ROI1, ROI2) Fokussierelektroden (36) angeordnet sind.

25

24. Untersuchungseinrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die erste Messstation (ROI1, ROI2, 53', 53'', 53''', 62, 63) und/oder die zweite Messstation (UF, 54', 54'', 54''') zur Aufnahme eines Bildes 30 eine Optik (44) aufweist.

25. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Optik (44) beweglich ist, um das Bild

zumindest entlang des Trägerstromkanals (33, 33', 33'', 33''', 58) zu verschieben.

26. Untersuchungseinrichtung nach Anspruch 25, **dadurch ge-5 kennzeichnet, dass** die Optik (44) zur Bildverschiebung mit einem elektro-mechanischen Stellglied (45) verbunden ist.

27. Verwendung einer Untersuchungseinrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 26 in der medizinischen und/oder pharmazeutischen Forschung und/oder in der Diagnostik und/oder in der forensischen Medizin. 10

28. Verwendung einer Untersuchungseinrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 26 zur Separation verschiedener Zelltypen 15 voneinander, wie insbesondere apoptischer und nekrotischer Zellen, Zellen mit unterschiedlichen Expressionsmustern und/oder Stammzellen.

* * * * *

16059/PCT

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft ein Untersuchungsverfahren für biologische Partikel, insbesondere zur Ausführung in einem Zellsortierer, mit den folgenden Schritten: Einbringung der zu untersuchenden Partikel in einen Trägerstrom, Durchführung einer ersten Untersuchung der sich mit dem Trägerstrom bewegenden Partikel, Selektion mindestens eines Partikels in Abhängigkeit von dem Ergebnis der ersten Untersuchung, Abbremsen des selektierten Partikels, Durchführung einer zweiten Untersuchung des selektierten Partikels im abgebremsten Zustand. Weiterhin umfasst die Erfindung eine entsprechende Untersuchungseinrichtung.

(Figur 1)

20

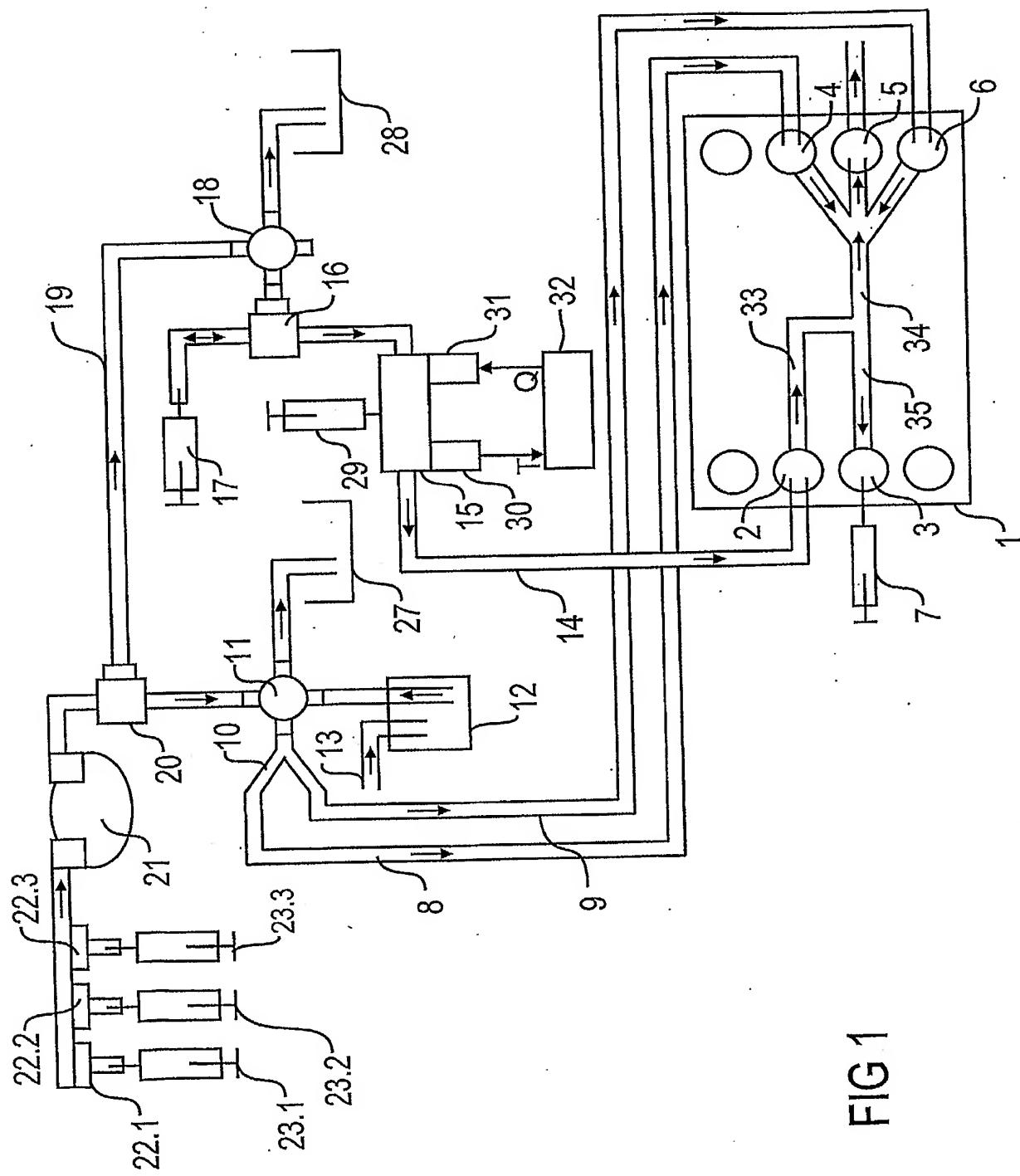


FIG 1

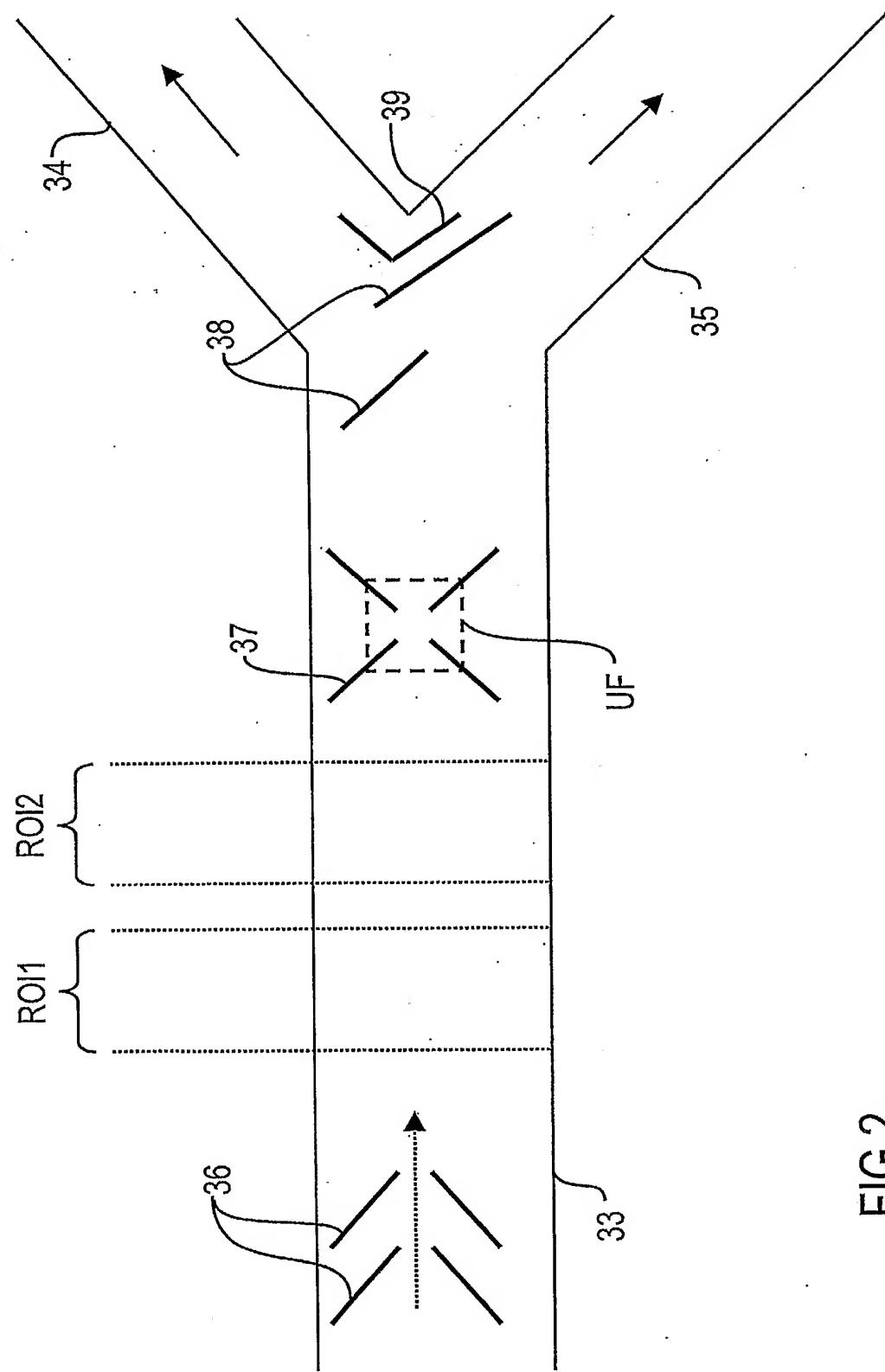


FIG 2

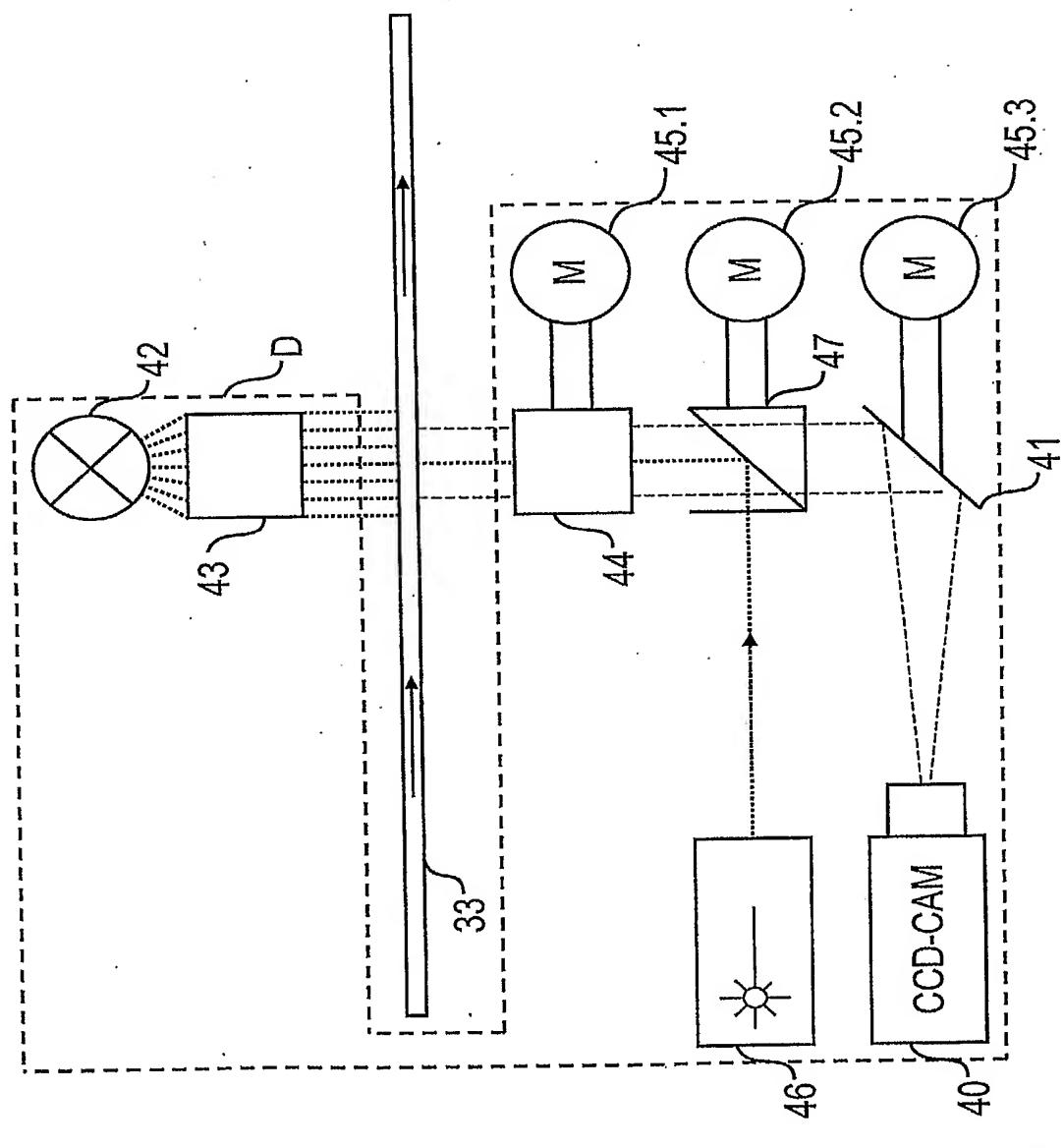


FIG 3

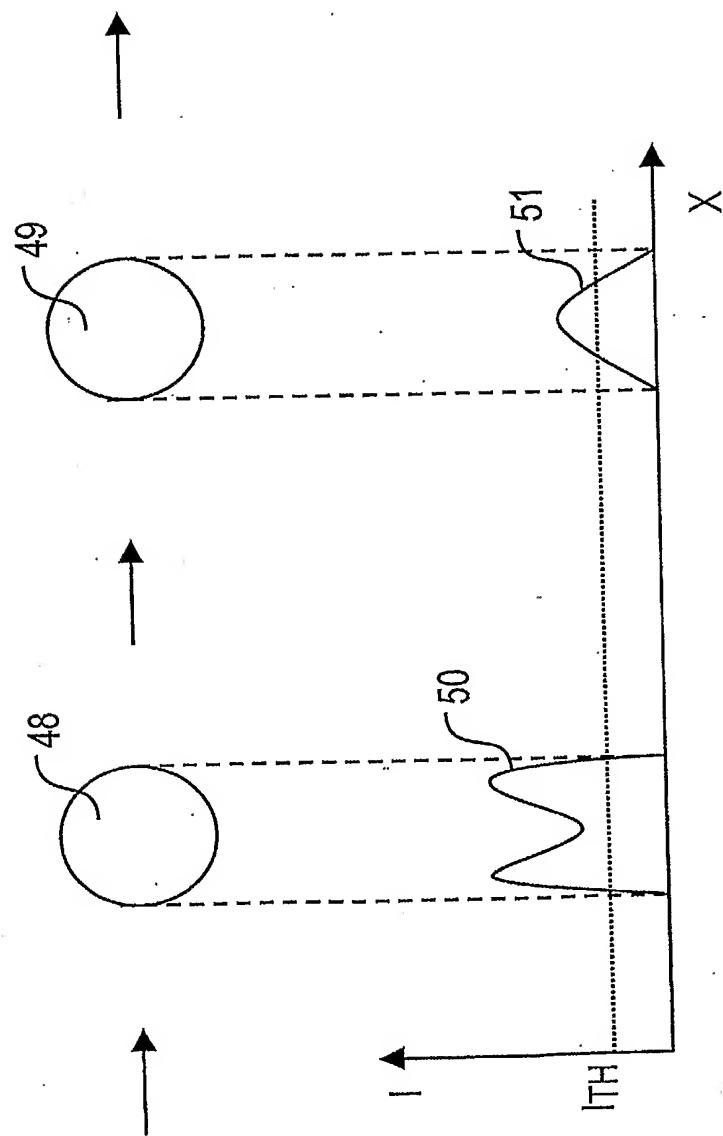


FIG 4

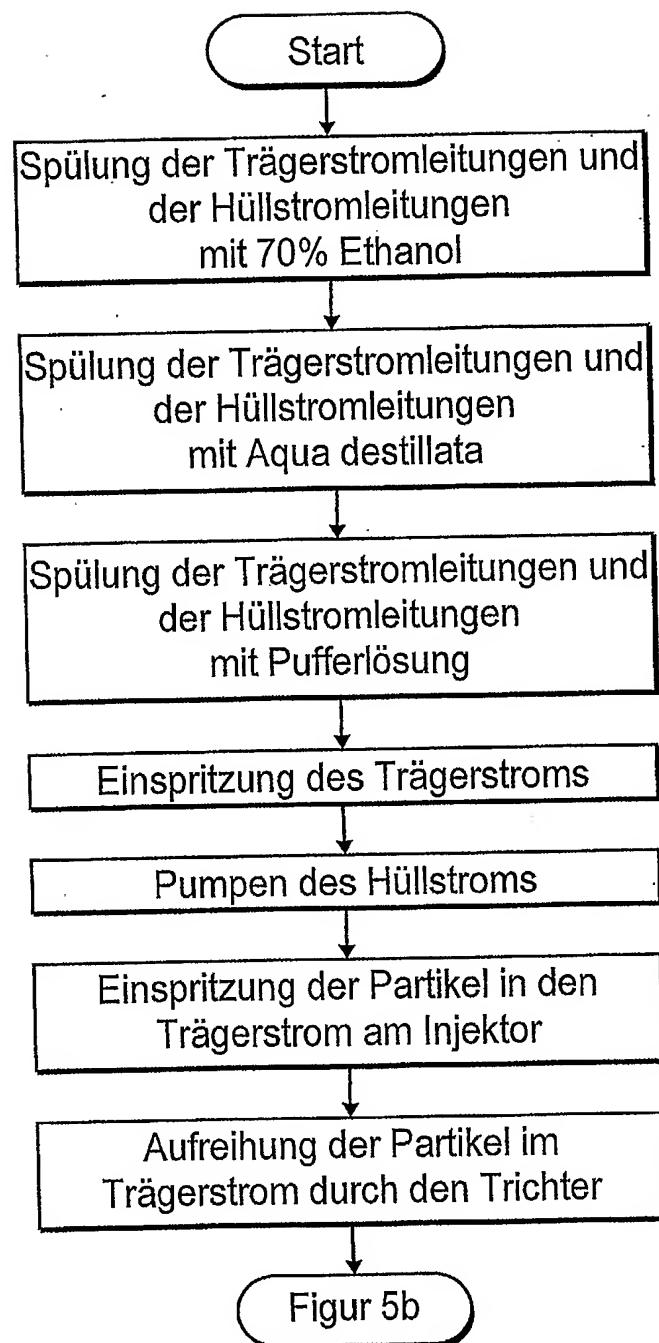


FIG 5a

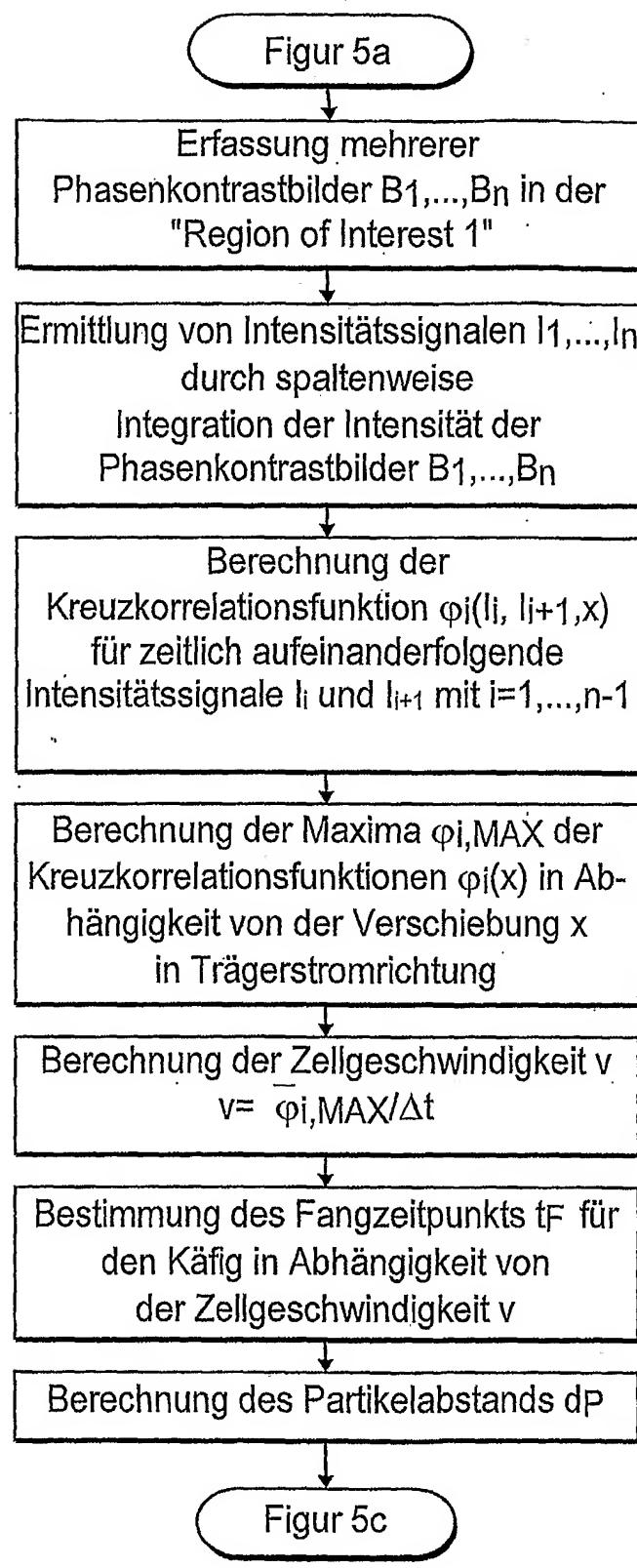


FIG 5b

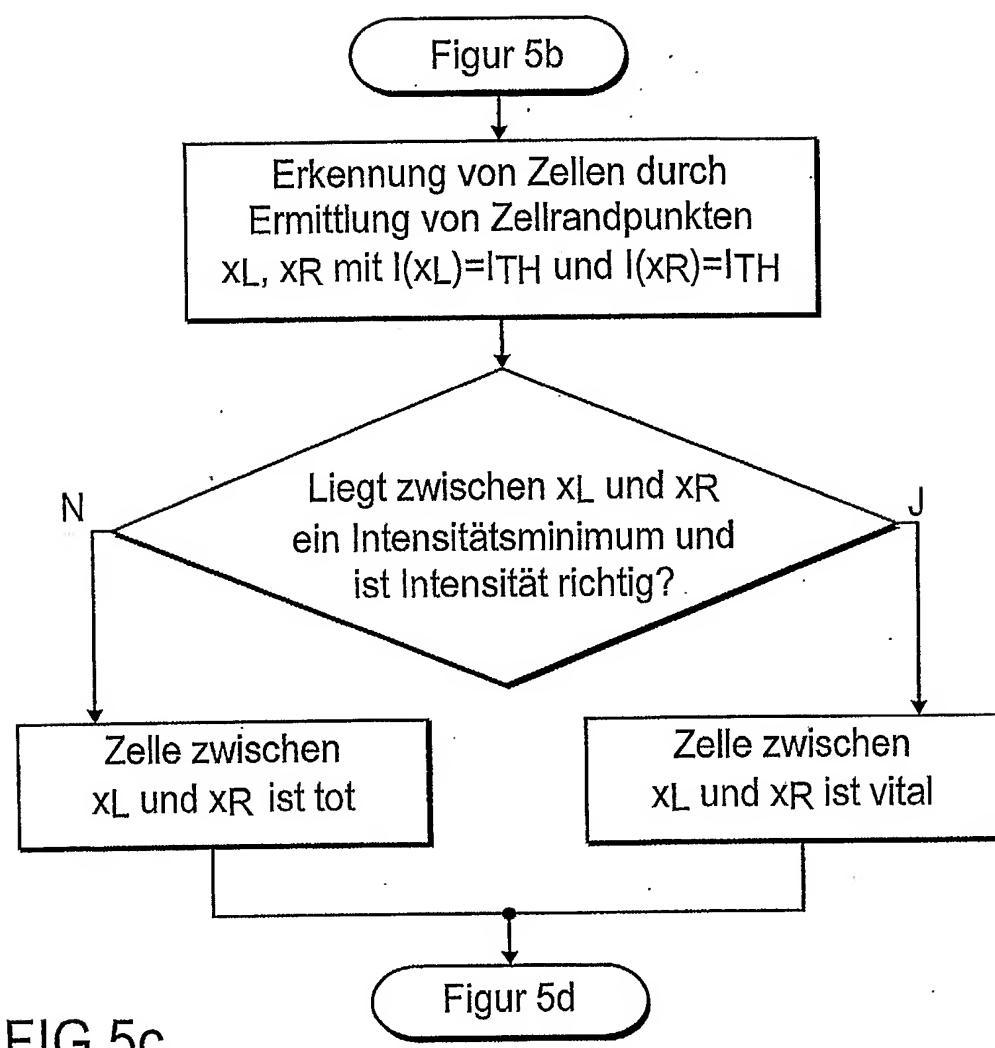


FIG 5c

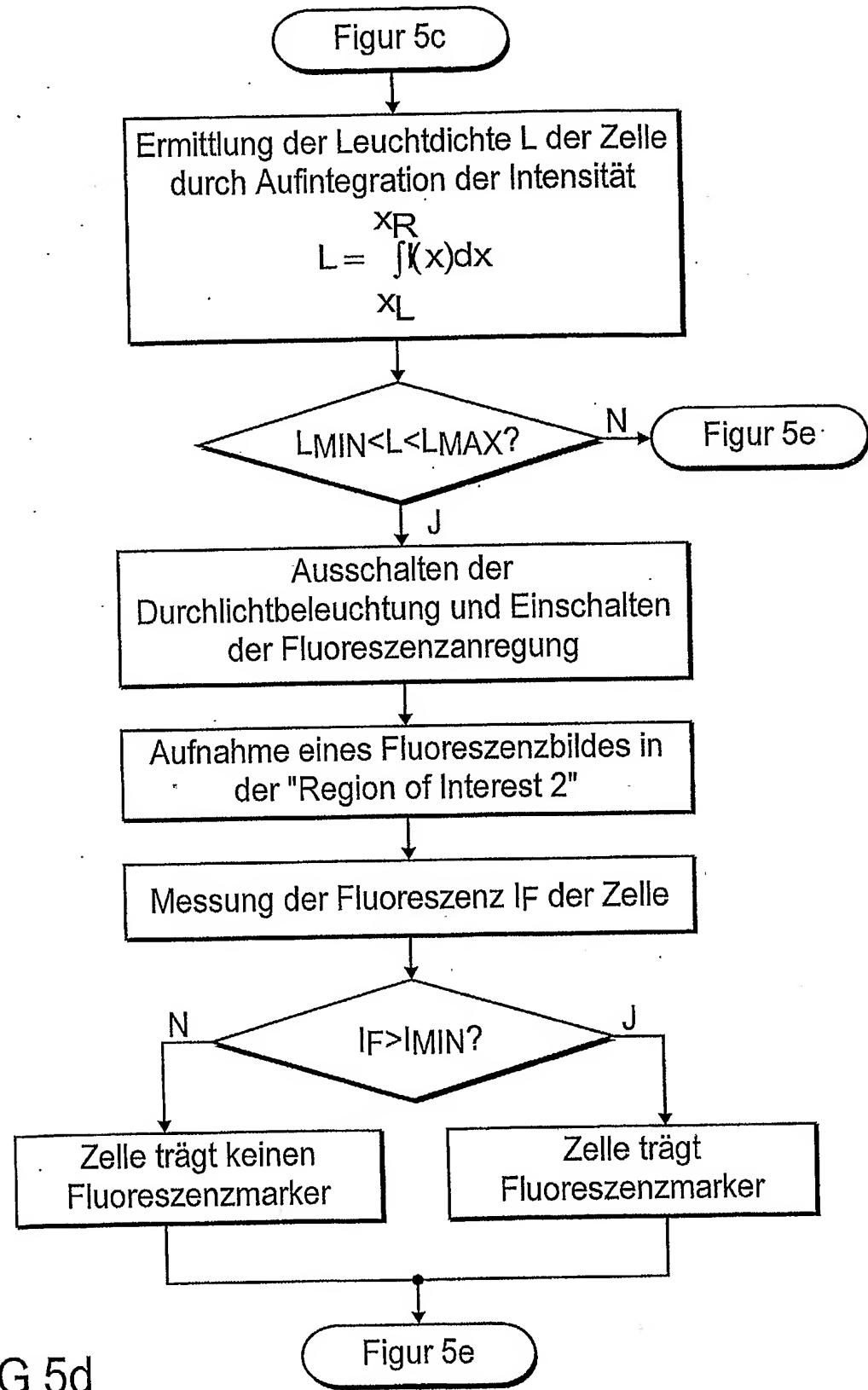


FIG 5d

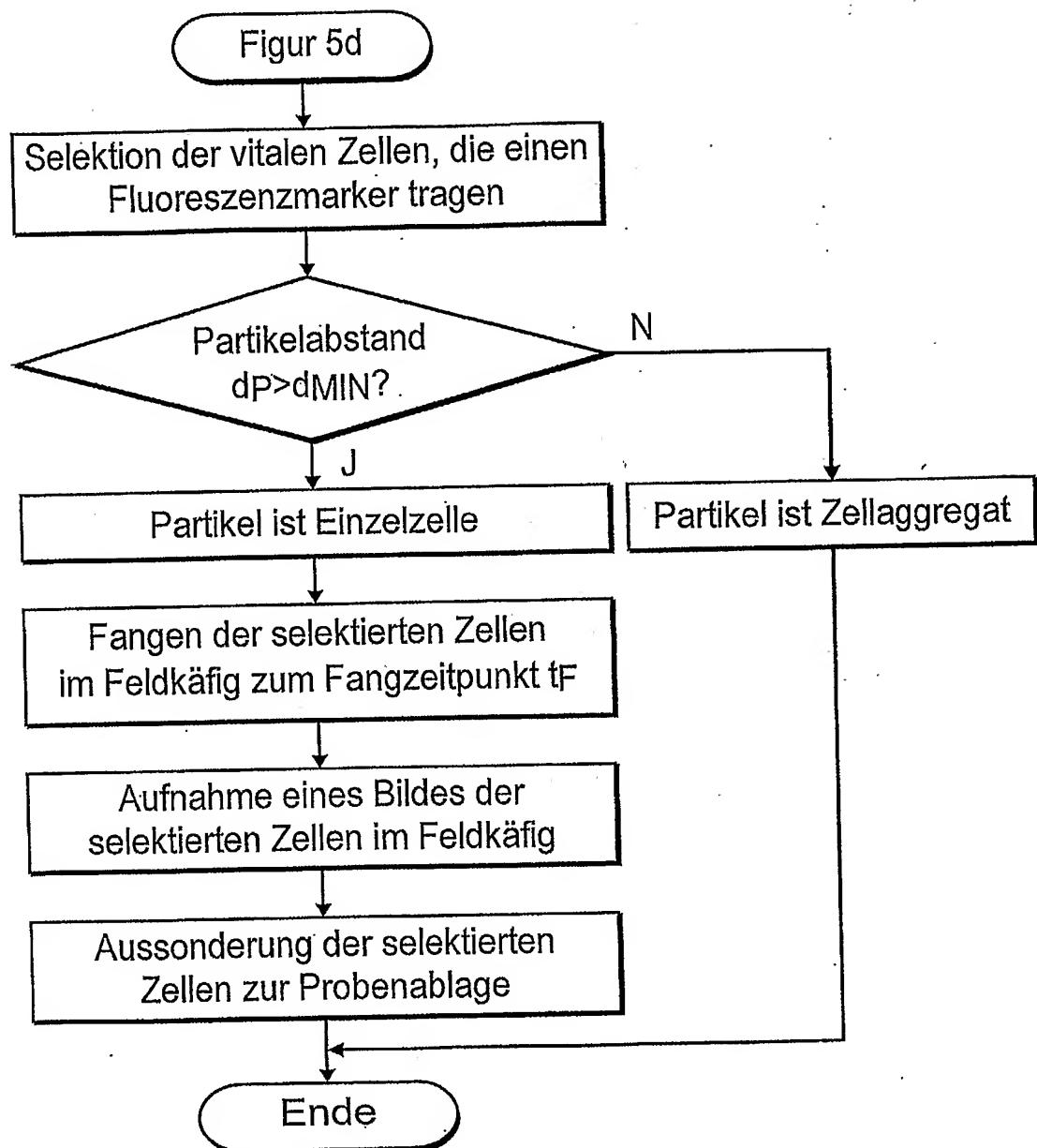
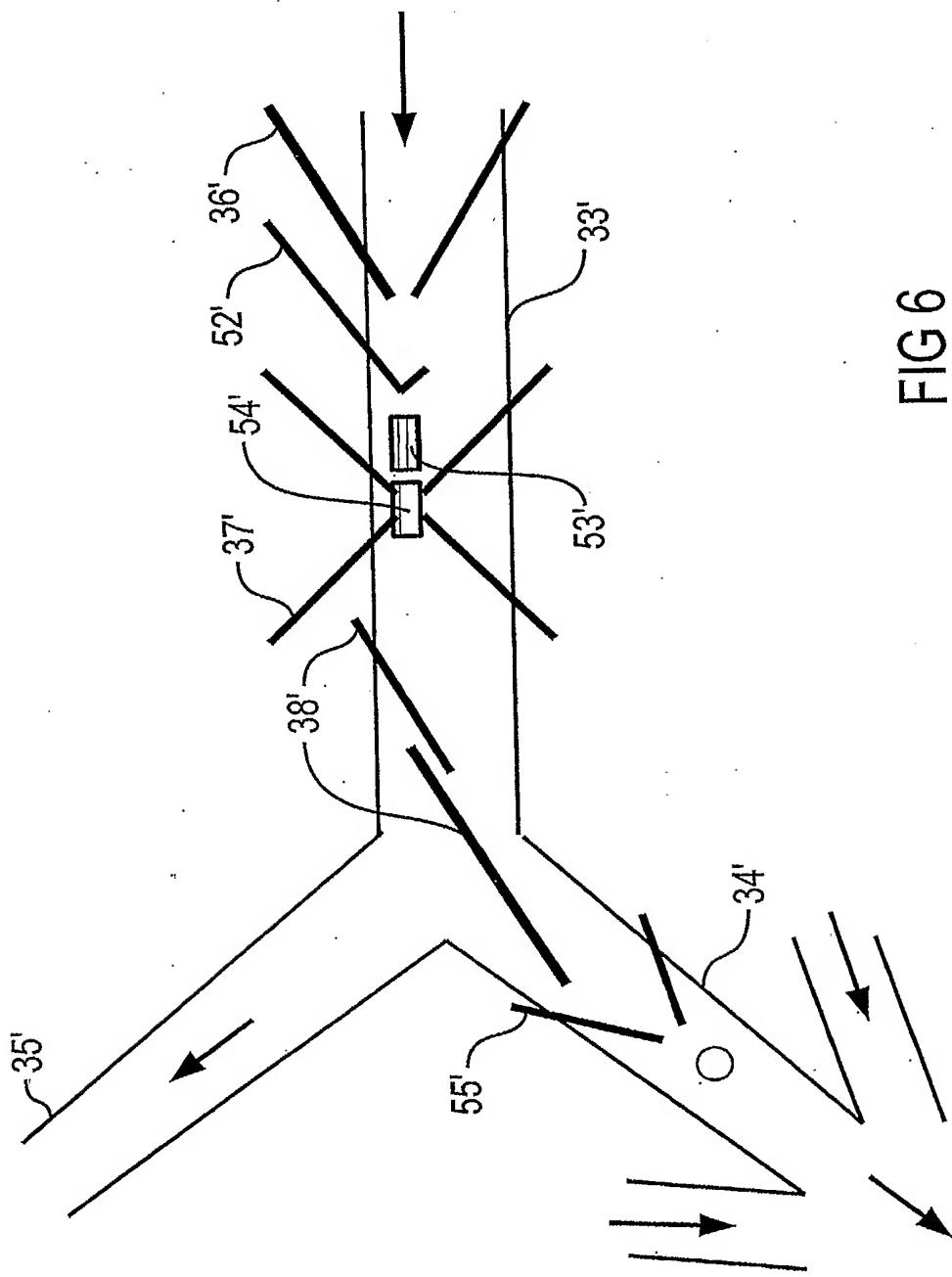
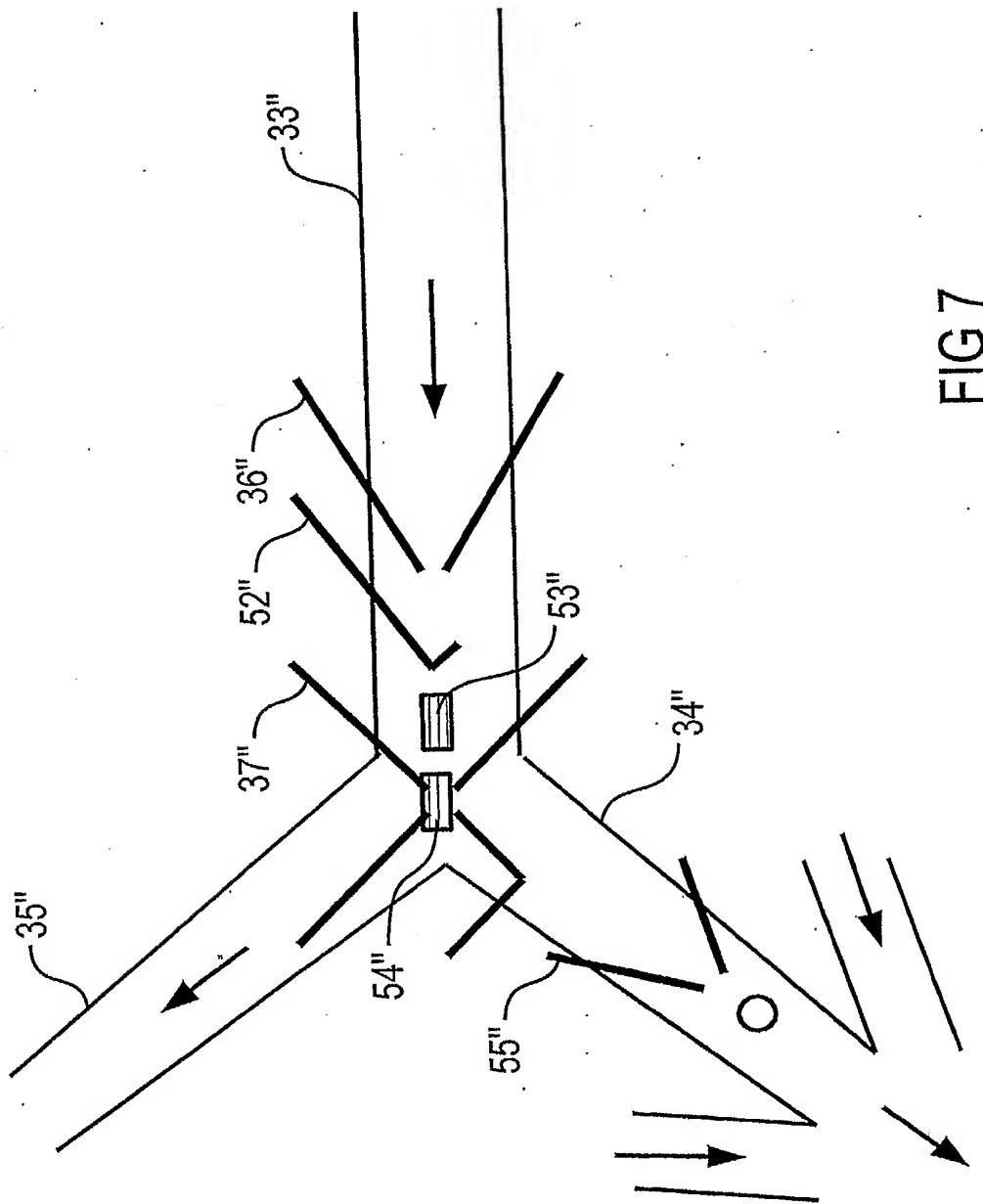


FIG 5e





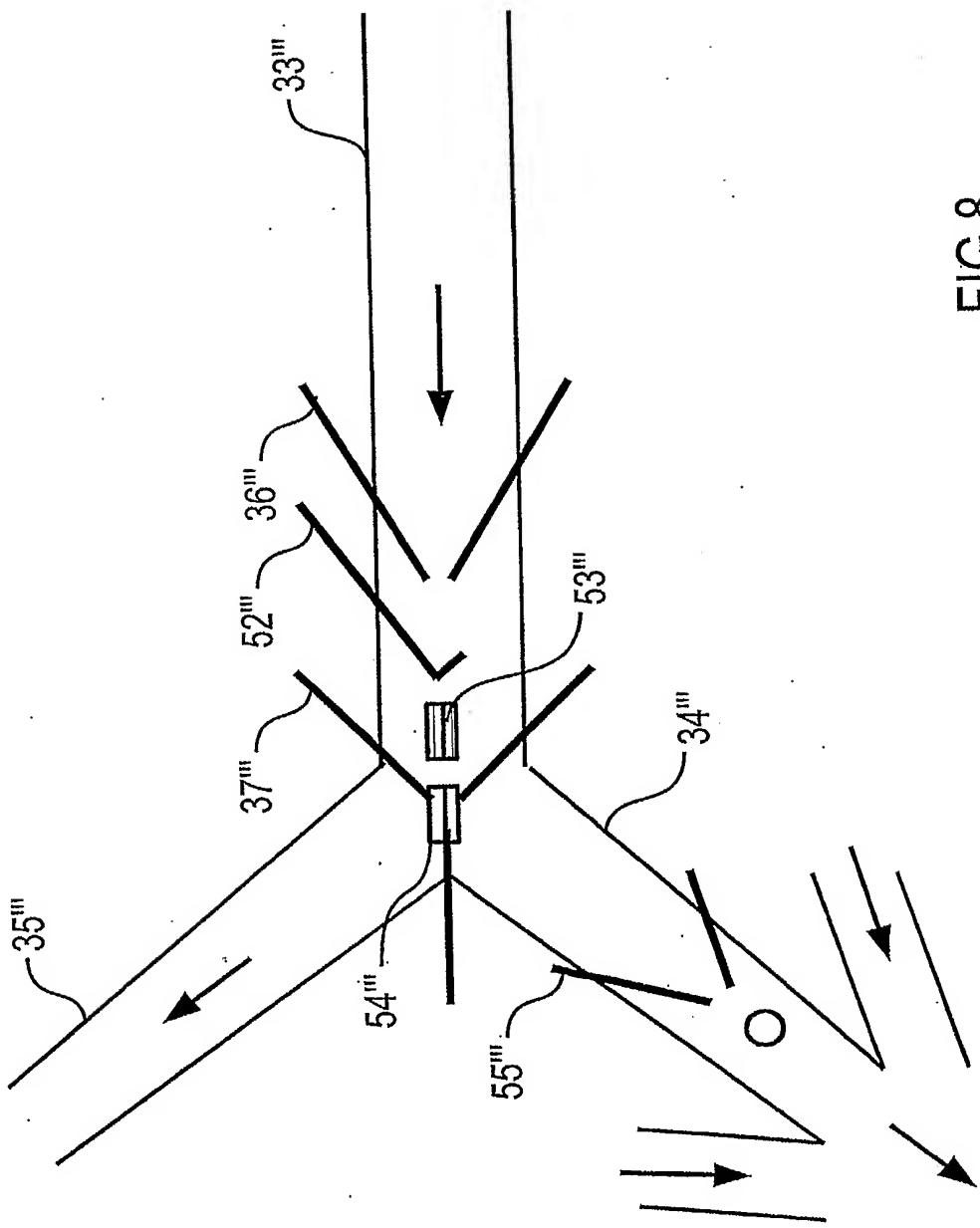


FIG 8

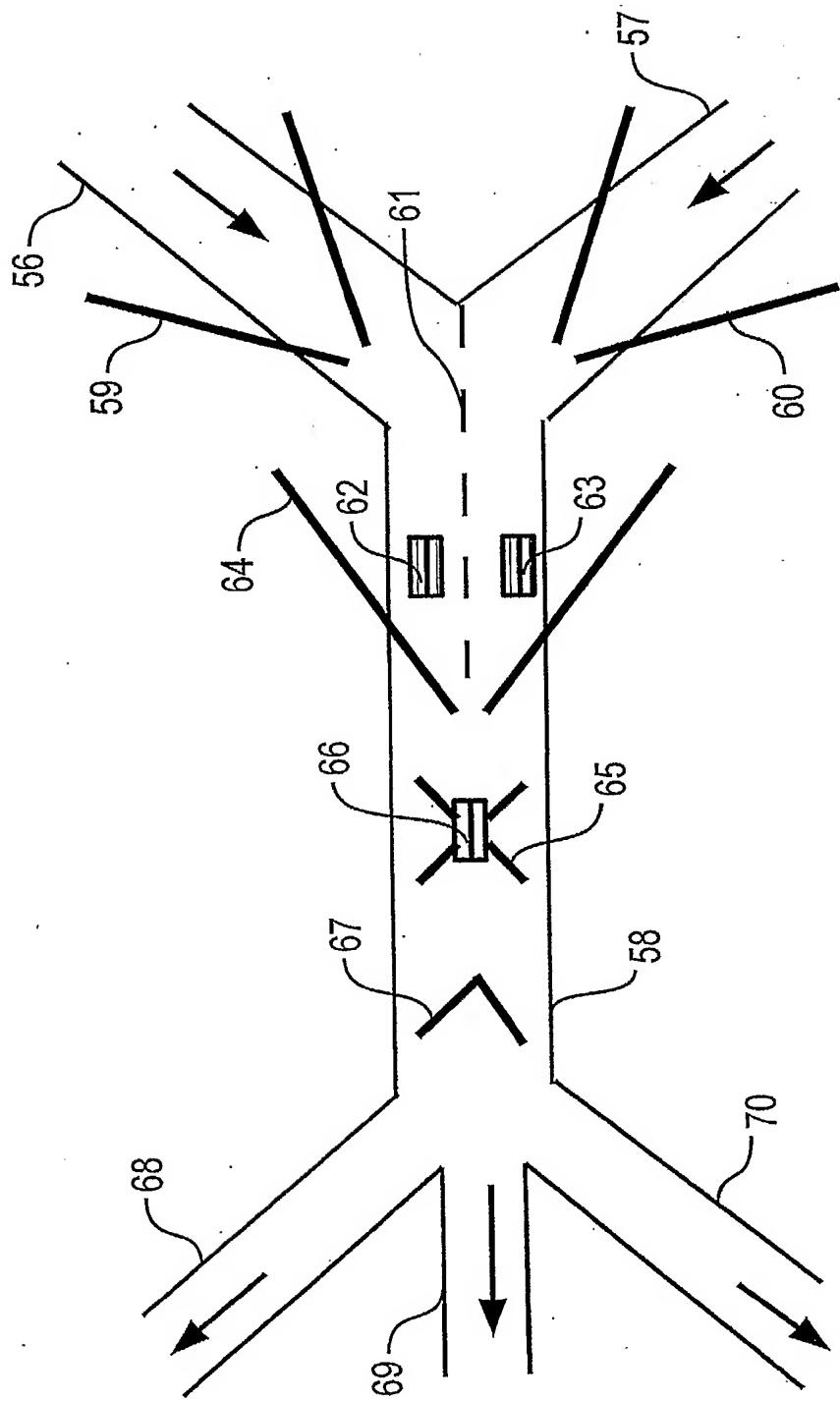


FIG 9